

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Efecto del estrés salino en el contenido de minerales de
cultivos semihidropónicos de tomate *Lycopersicon
esculentum* MILL (1768) c.v. Rio Grande**

TESIS

Para optar el grado académico de magíster en Bioquímica

AUTOR

Ramsés Salas Asencios

ASESOR

Mario Monteghirfo Gomero

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Fundada en 1551
FACULTAD DE MEDICINA



UNIDAD DE POST GRADO

ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 10 días del mes de diciembre del año dos mil quince siendo las 12.00 horas, bajo la presidencia de la Dra. María Mercedes Soberón Lozano con la asistencia de los Profesores: Dra. Silvia Suarez Cunza (Miembro), Mg. Luz Dora Velásquez Ramos (Miembro) Mg. José Enrique Olivera García (Miembro) y el Mg. Mario Monteghirfo Gomero (Asesor); el postulante al Grado de Magister en Bioquímica, Bachiller en Ciencias Biológicas, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"EFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN EL CONTENIDO DE MINERALES DE CULTIVOS SEMIHIDROPÓNICOS DE TOMATE *Lycopersicon esculentum* MILL (1768) c.v. RÍO GRANDE"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE 19**. A continuación la Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA** al postulante **RAMSÉS SALAS ASENCIOS**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 14:05 horas, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Dra. Silvia Suárez Cunza
Profesora Principal
Miembro

Mg. Luz Dora Velásquez Ramos
Profesora Auxiliar
Miembro

Mg. José Enrique Olivera García
Profesor Auxiliar
Miembro

Mg. Mario Monteghirfo Gomero
Profesor Principal
Asesor

Dra. María Mercedes Soberón Lozano
Profesora Principal
Presidenta

A mis hijos Gaby e Isaac.

A Betty, por todo su apoyo.

A mis padres, Margarita y Ladislao.

INDICE

	Página
Indice.....	lv
Lista de Tablas.....	vi
Lista de Figuras.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Situación Problemática.....	1
1.2 Presentación del Problema.....	2
1.3 Formulación del Problema.....	3
1.4 Justificación Teórica.....	3
1.5 Justificación Práctica.....	4
1.6 Objetivos.....	4
Capítulo 2: Marco Teórico.....	6
2.1 Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación.....	6
2.1.1 Hidroponía.....	6
2.1.2 Estrés Salino.....	7
2.2 Antecedentes.....	9
2.3 Bases Teóricas.....	15
a) Proteínas y Estrés salino.....	15
b) Prolina y Estrés Salino.....	17
c) Metabolismo de Azúcares y Estrés salino.....	19
d) Fotosíntesis y Estrés salino.....	23
e) Metabolismo de Lípidos y Estrés salino.....	26
f) Minerales y Estrés salino.....	31
Capítulo 3: Metodología.....	35
3.1 Tipo de Investigación.....	35
3.2 Material Biológico y ubicación del estudio.....	35

3.3 Obtención de cultivos semihidropónicos de tomate.....	35
3.4 Determinaciones bioquímicas.....	38
3.5 Análisis estadístico.....	43
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	44
4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados.....	44
4.2 Presentación de resultados.....	62
Conclusiones.....	89
Recomendaciones.....	91
Referencias Bibliográficas.....	92
Anexos.....	106

LISTA DE TABLAS

Tabla N°		Página
I	Análisis estadístico de los valores de proteínas totales (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.....	64
II	Análisis de comparaciones múltiples de los valores de proteínas totales de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.....	64
III	Análisis estadístico del contenido de prolina (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.....	66
IV	Análisis de comparaciones múltiples de los valores de prolina de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.....	66
V	Análisis estadístico del contenido de azúcares reductores (en mg/g peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.....	68
VI	Análisis de comparaciones múltiples de los valores de azúcares reductores de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.....	68
VII	Análisis estadístico del contenido de almidón (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.....	70
VIII	Análisis de comparaciones múltiples de los valores de almidón de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.....	70
IX	Análisis estadístico de la concentración de clorofilas (en mg/g peso fresco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad....	72
X	Análisis estadístico del contenido de lípidos totales (en mg/mL de extracto lipídico) en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	74
XI	Comparaciones múltiples del contenido de lípidos totales en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	74
XII	Análisis estadístico del contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	76
XIII	Comparaciones múltiples del contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	76
XIV	Análisis estadístico del contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	78
XV	Comparaciones múltiples del contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	78
XVI	Contenido de azúcares reductores (en mg/g peso seco) en frutos de tomate en	

	diferentes tiempos de cosecha.....	86
XVII	Valores de conductividad eléctrica en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.....	87
XVIII	Valores de pH en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.....	87
XIX	Contenido de minerales en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.....	88
XX	Análisis estadístico del contenido de Sodio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	111
XXI	Comparaciones múltiples del contenido de sodio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	111
XXII	Análisis estadístico del contenido de Potasio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	112
XXIII	Comparaciones múltiples del contenido de potasio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	112
XXIV	Análisis estadístico del contenido de Calcio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	113
XXV	Comparaciones múltiples del contenido de calcio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	113
XXVI	Análisis estadístico del contenido de Magnesio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	114
XXVII	Comparaciones múltiples del contenido de magnesio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.....	114
XXVIII	Contenido de Calcio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	116
XXIX	Contenido de Sodio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	117
XXX	Contenido de Potasio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	118
XXXI	Contenido de Magnesio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	119
XXXII	Contenido de Calcio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	120
XXXIII	Contenido de Sodio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	120
XXXIV	Contenido de Potasio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	121
XXXV	Contenido de Magnesio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.....	121
XXXVI	Contenido de Calcio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.....	122

XXXVII	Contenido de Sodio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.....	122
XXXVIII	Contenido de Potasio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.....	123
XXXIX	Contenido de Magnesio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Contenido de proteínas totales en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.....	63
2	Concentración de prolina en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.....	65
3	Contenido de azúcares reductores en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.....	67
4	Contenido de almidón (en μ g/g peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.....	69
5	Contenido de clorofilas (en mg/g peso fresco) y cociente clorofila a/clorofila b en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.....	72
6	Contenido de lípidos totales en plantas de tomate mantenidas en diferentes condiciones de Salinidad.....	73
7	Contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes condiciones de Salinidad.....	75
8	Contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes condiciones de Salinidad.....	77
9	Contenido de Sodio (A), Potasio (B), Calcio (C) y Magnesio (D) de plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes niveles salinidad.....	79
10	Comparación del contenido de minerales en hojas de tomate bajo estrés salino.....	82
11	Comparación del contenido de minerales en tallos y raíces de tomate bajo estrés salino.....	83
12	Recuperación del contenido de minerales en hojas y tallos de tomate en estrés salino y en condiciones normales.....	84
13	Cultivo semihidropónico de tomates en bandejas de tecnopor y en condiciones del laboratorio de Biotecnología UNFV.....	109
14	Sistema de riego por capilaridad utilizado en los cultivos de tomate en bandejas de tecnopor.....	109
15	Cultivo semihidropónico de tomate en baldes y en condiciones de invernadero.....	110
16	Comparación del tamaño y área de hojas de plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes niveles salinidad.....	110

RESUMEN

El objetivo de la Tesis fue analizar cultivos semihidropónicos de tomate *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande a fin de establecer el efecto del estrés salino sobre el contenido de minerales de hojas, tallo, raíz y frutos, así como su efecto sobre la composición de proteínas, azúcares, clorofila y lípidos. Para eso se mantuvieron tres tipos de cultivos semihidropónicos: uno en condiciones de laboratorio por 30 días, el segundo en condiciones de invernadero por un total de 130 días, y el tercero en condiciones de laboratorio por 66 días en total. Los resultados muestran que los cambios en el contenido de proteínas, azúcares, lípidos y minerales permiten considerar como condición estresante a 85 mM de NaCl en la solución de riego. Los cambios metabólicos que inicialmente ocurrieron fueron la disminución de almidón, clorofila y potasio, así como incremento de calcio, magnesio y proteínas. Se ha observado que los niveles de sodio, calcio y potasio fueron regulados a corto plazo, mientras que los del magnesio lo fueron a mediano o largo plazo. Las conclusiones del presente trabajo son que durante el estrés salino se genera una acumulación tóxica de sodio con una consecuente disminución de potasio, lo que principalmente sería la causa de los cambios en el metabolismo de azúcares, proteínas y lípidos; y que todos estos cambios metabólicos generan a su vez los cambios que se pueden observar en la calidad organoléptica del fruto.

Palabras clave: Estrés salino, tomate, contenido de minerales, lípidos, prolina, azúcares, clorofila.

ABSTRACT

The aim of this work is to analyze semi hydroponic tomato (*Lycopersicon esculentum* var. Río Grande) seedlings in order to assess the effect of salt stress over mineral contents in leaves, stem, roots and fruit, as well as over the proteins, sugars, lipids and chlorophyll composition. Three types of semi hydroponic cultures were kept: one in laboratory conditions for 30 days; the second in greenhouse condition for 130 days, and the third in laboratory conditions for 66 days. Results show that changes in the concentration of proteins, sugars, lipids and minerals would let consider 85 mM of NaCl in the hydroponic medium as a stress condition. Metabolic changes firstly occurring are starch, chlorophyll and potassium decrease, and an increase of calcium, magnesium and proteins. Also, it has observed that levels of sodium, calcium and potassium were regulated in short term, unlike the magnesium metabolism, which is regulated in medium or long term. Our conclusions are that salt stress produces toxic accumulations of sodium which causes decreasing on potassium levels, and it causes changes observed in sugar, protein and lipid metabolism. Besides, all these metabolic changes are generating changes in the organoleptic features of fruits.

Key words: Salt stress, tomato, minerals content, lipids, proline, sugars, chlorophyll.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA:

La salinidad de los suelos es un problema bastante serio en países como el Perú, donde las tierras cultivables representan el 3.3% de todo el territorio nacional, y en donde ya en 1970, el ONERN había establecido que el 40% de los valles costeros sufría de este fenómeno (Lee y Elgregen, 2007). De ahí que es importante estudiar los efectos del estrés salino sobre los cultivos a fin de poder hacer frente a la sintomatología presente en las plantas afectadas y comprender los procesos de tolerancia o resistencia que se generen con el fin de, en un futuro, poder utilizarlos para adaptar a los ambientes salinos a una mayor proporción de cultivos de interés económico para el hombre.

Existen muchos trabajos sobre el efecto del estrés salino sobre las plantas y que usan herramientas de Biología Molecular en cultivos de tejido o células, pero en los cuales no se analizan de manera integral fenómenos como, por ejemplo, los cambios producidos por el estrés salino sobre el contenido de minerales, azúcares, proteínas y/o lípidos. La hidroponía puede ser un modelo alternativo aceptable, puesto que en este tipo de cultivos, se pueden controlar las

condiciones nutricionales y ambientales, aislando así los efectos producidos por el estrés salino en las plantas.

1.2 PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA:

Las plantas pueden encontrarse sometidas a situaciones desfavorables para su desarrollo y funcionamiento óptimo. El conjunto de condiciones ambientales desfavorables recibe el término de estrés ambiental, como por ejemplo el estrés hídrico, el térmico y el salino. Procesos tales como la germinación, crecimiento y vigor vegetativo, y la generación de flores y frutos son afectados de manera adversa por altas concentraciones de sal, causando un rendimiento disminuido y una pobre calidad de los productos (Sairam y Tyagi, 2004).

Por medio de la Selección Natural, las plantas han adquirido una variedad de mecanismos regulados genéticamente que les permiten adaptarse y sobrevivir en estos medios adversos (Azcon-Bieto y Talon, 1996). Uno de estos mecanismos es la síntesis y acumulación intracelular de metabolitos osmóticamente activos tales como azúcares y sus derivados polioles, prolina y betaínas (Wyn Jones, 1984), así como de proteínas como la osmotina (Singh y col., 1985) que estabilizan a otras proteínas y a las membranas cuando están presentes en altas concentraciones y pueden ser usadas sin efectos deletéreos para aumentar la presión osmótica del citoplasma en células estresadas (Hanson y col., 1994). Otros mecanismos involucran la compartimentalización de iones tóxicos como el sodio por ejemplo, o la movilización de otros iones, sean potasio o calcio. Principalmente, este marco teórico ha sido elaborado a partir de los estudios e investigaciones realizadas en cultivos celulares, haciendo válida la pregunta de si estos procesos moleculares pueden reflejar también cambios

detectables en el desarrollo y metabolismo de toda la planta, ya que para generar estrategias que permitan la adaptación al estrés salino de cultivos de interés productivo es importante tener un cuadro global de los efectos de la salinidad sobre el metabolismo de las plantas y la movilización y/o secuestro de minerales para comprender así toda la sintomatología producida por el estrés.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

- ¿El estrés salino genera efectos en el contenido de minerales de cultivos semihidropónicos de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (1768) var. Rio Grande?

1.4 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA:

La gran mayoría de trabajos de investigación en estrés salino son realizados a nivel de cultivos celulares o en semillas germinadas (Raymond y Smirnov, 2002), trabajos que permiten estudiar de manera eficiente y aislada ciertos procesos bioquímicos y celulares en detrimento del estudio del efecto total sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. En base a lo mencionado, los cultivos hidropónicos (y sobre todo los semihidropónicos, en donde se usan sustratos sólidos sobre los que se desarrollan las plantas) pueden servir como modelos adecuados para estudiar los efectos del estrés salino sobre el desarrollo y el crecimiento de las plantas, debido a la posibilidad de poder modificar la concentración de nutrientes y de sal y la facilidad de realizar extracciones cuidando la integridad de toda la planta (Rodrigo y Salas, 2001). Por todo esto, los cultivos semihidropónicos pueden servir como un óptimo modelo de estudio del efecto del estrés salino sobre el crecimiento y la productividad de plantas en estrés salino.

1.5 JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA:

El estrés salino es uno de los problemas más importantes que enfrenta la agricultura a nivel mundial. Aproximadamente el 20% del área cultivada y casi la mitad de la tierra irrigada a nivel mundial sufre los efectos de la salinidad (Sairam y Tyagi, 2004), generando una reducción del crecimiento de la planta por déficit de agua, toxicidad por iones, desbalance por iones o por combinación de estos factores. Por otro lado, el manejo de la salinidad en la solución de riego ha sido utilizado como un factor con el cual se pueden obtener tomates de mayor calidad en características comerciales como el color y el sabor (Hao y col., 1999). Para todo esto, se deben tomar en cuenta parámetros tales como la sintomatología producida y las respuestas metabólicas de la planta, sobre todo en el contenido de las principales biomoléculas y elementos minerales.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del estrés salino en el contenido de minerales de cultivos semihidropónicos de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (1768) var. Río Grande.

1.6.2. Objetivos específicos

- a) Obtener cultivos semihidropónicos de tomate de 30, 66 y 130 días mantenidos con solución nutritiva normal y con presencia de estrés salino.
- b) Cuantificar el grado en el cual el contenido de azúcares, proteínas, aminoácidos y lípidos se ve afectado por una concentración de sal definida como estresante en cultivos semihidropónicos de tomate.

- c) Cuantificar la variación en el contenido de minerales de cultivos semihidropónicos de tomate en condiciones de estrés salino.
- d) Analizar si la variación en el contenido de minerales es una respuesta inducida por el estrés salino.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 MARCO FILOSÓFICO O EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. HIDROPONÍA

La hidroponía es un término acuñado en 1929 por William F. Gericke, aunque se han descubierto documentos que describen técnicas desde finales del siglo XVII (Conn y col., 2013). Es una tecnología que permite el cultivo de plantas directamente en solución acuosa de sales y minerales, con o sin el uso de un sustrato inerte como soporte mecánico (Lara, 1999). El hecho que se puedan usar sustratos inertes como soporte de las plantas ha permitido la redefinición de hidroponía como “el cultivo de plantas sin suelo” (Sorenson y Relf, 2009). Decir que si se usa una matriz mecánica, ésta debe ser inerte, significa que no debe tener un significativo intercambio de cationes, para que principalmente se dedique a sostener a las plantas y airear su sistema radicular (Berry y Knight, 1997). Este tipo de cultivos también se conoce como “en agregado” y uno de los sustratos más utilizados por su disponibilidad es la arena, con riego por goteo (Lara, 1999) o por inundación (Sorenson y Relf, 2009).

En hidroponía, los nutrientes que necesitan las plantas están presentes en la Solución de Riego o Solución Nutritiva y se evalúa su concentración a través de

la Conductividad Eléctrica. La proporción de cada nutriente depende de la especie, la variedad, la etapa fenológica y las condiciones ambientales (Sorenson y Relf, 2009).

Los sistemas de crecimiento hidropónico son una plataforma conveniente para estudiar la fisiología de la planta entera en laboratorio, además de permitir el cultivo comercial de plantas. Las ventajas que brinda para la investigación son el potencial para la accesibilidad a todos los tejidos de la planta y la fácil manipulación del perfil de nutrientes en la solución de crecimiento a comparación del suelo, dada la compleja interacción de iones con las partículas del suelo (Conn y col., 2013).

Se puede combinar el uso de los sistemas hidropónicos con el de invernaderos a fin de poder controlar la temperatura, reducir la pérdida de agua por evaporación, controlar la presencia de plagas y enfermedades de las plantas y proteger a los cultivos de factores ambientales como el viento, la lluvia y el contacto de los cultivos con animales y otras plantas (Sorenson y Relf, 2009).

2.1.2 ESTRÉS SALINO

En el mundo, cerca del 7 % del área del suelo a nivel global está afectado por la salinidad (Almodares y col., 2008). Esto corresponde a un 20% de la tierra agrícola irrigada. Sólo en Asia, se ha calculado que 21.5 millones de hectáreas de tierra están afectadas por sal (Vazan y Torabi, 2013). La acumulación de sal está relacionada principalmente a un clima seco, materiales parentales ricos en sal para la formación del suelo, drenaje insuficiente y agua subterránea o irrigación con agua salina (Almodares y col., 2008).

El mayor efecto inhibitorio de la salinidad sobre el crecimiento de la planta ha sido atribuida a (1) el efecto osmótico, (2) la toxicidad iónica y (3) el desequilibrio nutricional que lleva a la reducción de la eficiencia fotosintética y otros desórdenes fisiológicos (Ali y col., 2004). El estrés osmótico genera una escasez de agua (estrés hídrico) que reduce la expansión celular en los extremos de la raíz y en las hojas jóvenes, causando también un cierre de estomas. Finalmente, el desequilibrio iónico afecta el metabolismo de la planta (Turan y Tripathy, 2015).

A nivel celular, el exceso de sal causa la deposición de materiales a nivel de pared celular, disminuyendo su elasticidad. Esto no permite el crecimiento celular, afectando el área foliar (Ali y col., 2004; De Lucena y col., 2012), factor que regula la capacidad fotosintética de la planta y así alterando su capacidad metabólica. Los cambios en estos parámetros van a depender de la severidad y duración del estrés y de la especie de planta (Amirjani, 2010).

Durante la exposición inicial al estrés salino, las plantas experimentan el estrés hídrico, que reduce la expansión de las hojas. Durante un mayor tiempo de exposición a la salinidad, las plantas experimentan un estrés iónico, que puede llevar a una senescencia prematura de las hojas adultas. Se producen deficiencias minerales como del zinc y fósforo, y toxicidades como de hierro, aluminio, y ácidos orgánicos (Amirjani, 2010).

Los mecanismos de defensa para la tolerancia a la sal incluyen la osmoregulación, exclusión de sales, estabilización de membrana, antioxidantes y liberación de hormonas (Boriboonkaset y col., 2012). El estudio de la respuesta al estrés salino en plantas enteras (con un nivel organizacional complejo a

diferencia de los cultivos celulares y cultivos de callos) permite analizar procesos como la exclusión de iones en raíz, excreción de iones en brotes o retoños, y deposición de iones en tejidos viejos (Wu y col., 2005).

2.2 ANTECEDENTES

Jamil y Rha (2013) investigaron el efecto del estrés salino en la germinación y crecimiento temprano de semillas de mostaza, así como sobre la fotosíntesis y la actividad proteica, observando que el porcentaje de germinación, la longitud y el peso fresco de los cultivos, así como el área foliar y el número de hojas disminuyeron significativamente. El contenido de clorofila aumentó considerablemente a medida que se aumentaba la concentración de NaCl en el medio, al igual que el contenido total de proteínas hasta los 100 mM de sal, para luego disminuir a los 150 mM.

Riccardi y col. (1998) analizaron los cambios en el contenido proteico generado en respuesta a un déficit progresivo de agua en plantas de maíz, encontrando que 78 proteínas de un total de 413 mostraron diferencias significativas en dos genotipos no relacionados entre sí, 11 de las cuales aumentaron casi 5 veces en plantas con estrés hídrico.

Yan y col. (2005) extrajeron proteínas totales de las raíces de arroz tratadas con 150 mM de NaCl hasta por 3 días, observando que 34 de aproximadamente 1100 proteínas detectadas por electroforesis bidimensional se expresaban más que en las raíces control, mientras que 20 se expresaban menos. El análisis con espectrometría de masas les permitió identificar 10 proteínas presentes en las plantas bajo estrés salino, envueltas en la regulación del metabolismo de carbohidratos, del nitrógeno y del metabolismo energético, además de la

eliminación de las especies reactivas de oxígeno, procesamiento del RNAm y de proteínas, y estabilidad del citoesqueleto.

Manaa y col. (2013) realizaron el análisis proteómico en plantas de tomate mantenidas en un medio con 0, 100 y 200 mM de NaCl, encontrando 26 proteínas con variaciones significativas en cuanto a su cantidad, algunas de las cuales están envueltas principalmente en el metabolismo energético, y esta expresión era diferente según el grado de tolerancia a la salinidad de cada cultivar.

Turan y col. (2009) investigaron el efecto del NaCl sobre el crecimiento, resistencia estomática, prolina y concentración total de clorofila en cultivos de maíz bajo condiciones de invernadero, encontrando que el peso seco de las plantas disminuyó al igual que el contenido total de clorofila, mientras que aumentaron el contenido de prolina y la resistencia estomática.

Molazem y col. (2010) evaluaron el efecto de la salinidad sobre el contenido de prolina, sodio y clorofila en 8 cultivares de maíz, observando diferencias significativas entre los cultivares estudiados cuando se hizo un análisis combinado del efecto del estrés salino. El contenido de clorofila disminuyó bajo condiciones de estrés.

Akça y Samsunlu (2012) investigaron los efectos de la salinidad del agua de riego sobre el contenido de clorofila (entre otras variables) en tres cultivos de nogal, encontrando una disminución del crecimiento de las plantas y del contenido de las clorofilas a y b en condiciones de salinidad. Los contenidos de clorofila a y b, prolina y sodio en relación a los diferentes niveles de salinidad mostraron

diferencias significativas, mientras que el contenido de clorofilas entre cultivares no presentaron diferencias significativas.

Rubio y col. (2010) utilizaron cultivos hidropónicos de plantas de pimienta bajo 30 mM de NaCl y estudiaron el rol del potasio bajo estas condiciones, observando que la salinidad redujo el peso seco de los órganos reproductivos y de las ramas, pero no el de las raíces. Se observó también un aumento en las concentraciones de cloro, fructosa, glucosa y mio-inositol en hojas de plantas con estrés salino. Aumentando la concentración de potasio en la solución hidropónica, también se aumentó la tolerancia a la sal, percibida por un incremento en el peso seco de las ramas y raíces.

Vazan y Torabi (2013) estudiaron cultivos hidropónicos de dos genotipos de arroz, uno tolerante y otro sensible a la salinidad, observando que la acumulación de sodio fue mayor en el genotipo sensible (lo que indicaba que estas plantas no eran capaces de exclusión de sal) y que el estrés salino causaba una disminución de glucosa en raíces de las plantas sensibles, mientras que aumentó en el cultivo tolerante. Similares resultados se observaron en relación al contenido de fructosa, y al contenido de sacarosa en la parte aérea de las plantas.

Siringam y col. (2011) estudiaron la acumulación y la homeostasis de iones, daño a nivel de membrana, contenido hídrico, caracteres de crecimiento y contenidos de azúcar en raíces de arroz en respuesta al estrés salino bajo condiciones iso-osmóticas, observando un aumento en la proporción Na/K, lo que generaba daño en la membrana celular, y una disminución en el contenido hídrico. Por otro lado, se observó también una disminución en los caracteres de crecimiento, como por

ejemplo número, longitud y peso fresco y seco. Metabólicamente, se observó una acumulación de azúcares, lo que se relacionó a un ajuste osmótico para mantener la disponibilidad de agua.

Ali y col. (2004) analizaron la tolerancia a la sal en 18 genotipos de arroz, mostrando que la producción por planta, las concentraciones de clorofila, el porcentaje de fertilidad y otros parámetros de crecimiento disminuyeron por la salinidad, aunque algunos genotipos mostraron menor variación en estas variables, lo que les permite ser considerados como tolerantes a la sal.

Jaleel y col. (2008) evaluaron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos y acumulación de metabolitos secundarios alcaloides en *Catharanthus roseus*, encontrando que a bajos niveles de salinidad se observaba una ligera disminución de los contenidos de clorofila a y b, pero bajo elevados niveles de salinidad, la reducción de estos pigmentos era significativa. La proporción clorofila a/clorofila b bajo estrés salino también presentó una reducción significativa.

De Lucena y col. (2012) investigaron el efecto del estrés salino sobre la fluorescencia de clorofila en mango, mostrando que hubo una disminución tanto en el número de hojas como en el contenido de clorofilas a medida que aumentaba la salinidad en el medio.

Santos (2004) analizó el efecto de concentraciones en aumento de NaCl sobre el contenido de clorofila y fluorescencia del pigmento en *Heliantus annuus*, encontrando que ambas variables disminuyeron en función de la concentración de sal en el medio. También mostró que la actividad clorofilasa es estimulada durante los primeros días de desarrollo en hojas bajo estrés moderado, pero es

afectada por altas concentraciones de sal. Al estudiar el efecto de la sal sobre la síntesis de clorofila, encontró que sólo 50 y 100 mM de NaCl fueron las concentraciones en las cuales se observó la inhibición de la síntesis del ácido 5-aminolevulínico, un precursor de la clorofila, por lo que concluyó que el estrés salino tiene un efecto mayor sobre la síntesis de clorofila más que sobre su degradación enzimática.

Turan y Tripathy (2015) demostraron que el estrés salino generaba a una disminución de las actividades de enzimas de la biosíntesis de clorofila, como la 5-aminolevulínico (ALA) dehidratasa (EC-2.4.1.24), porfobilinógeno desaminasa (EC-4.3.1.8), coproporfirinógeno III oxidasa (EC-1.3.3.3), protoporfirinógeno IX oxidasa (EC-1.3.3.4), Mg-protoporfirina IX quelatasa (EC-6.6.1.1) and protoclorofilide óxidoreductasa (EC-1.3.33.1). La reducción de estas actividades enzimáticas parece deberse a una subregulación de la expresión de sus genes. Similares efectos fueron descritos como efecto del estrés hídrico.

Sueldo y col. (1996) estudiaron la composición de ácidos grasos y fosfolípidos, así como el recambio de fósforo en la fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina en coleóptilos de *Triticum durum* bajo estrés osmótico, encontrando 6 clases de ácidos grasos y 11 de fosfolípidos, y un aumento del índice de enlaces dobles durante el crecimiento del coleóptilo, siendo el incremento más pronunciado debido al estrés hídrico generado.

Sevengor y col. (2011) estudiaron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento, contenido de clorofila, peroxidación lipídica y enzimas antioxidativas de cuatro genotipos de calabaza, encontrando que el estrés salino generaba una disminución en el peso de la raíz y tallos, así como el contenido de clorofila en

los genotipos sensibles a la salinidad más que en los genotipos tolerantes. Estos autores consideraron que la disminución de clorofila observada podría deberse al aumento inducido por la salinidad de la actividad de la enzima clorofilasa. En los genotipos tolerantes a la sal, la disminución de clorofila fue menor, quizá debido a las actividades antioxidantes de enzimas que previnieron la degradación de la clorofila.

López-Pérez y col. (2009) estudiaron los efectos del estrés salino sobre la composición lipídica de la membrana de vesículas de la raíz de brocoli y cómo estos cambios podían afectar el transporte de agua a través de las acuaporinas, observando que a 0, 40 ú 80 mM de sal, existían diferencias significativas en cuanto a los niveles de ácidos grasos y esteroides, y que la salinidad incrementó la síntesis de ácidos linoleico y linolénico, así como del estigmasterol, pero disminuyó la síntesis de ácidos palmitoleico y oleico, así como del sitosterol. Por otro lado, dichos autores mostraron que el índice de insaturación aumentó con la salinidad.

Taffouo y col. (2010) estudiaron el efecto del estrés salino sobre seis cultivares de tomate, encontrando un aumento del contenido de sodio en raíz, tallo y hojas, mientras que el contenido de potasio y calcio disminuyeron. Algunos cultivares (considerados tolerantes o moderadamente tolerantes a la salinidad) no modificaron significativamente su contenido de clorofila.

Casierra y col. (2000) analizaron las concentraciones de potasio, calcio, magnesio y cloro en hojas, tallos y raíces en plantas de Lulo, mantenidas en invernadero bajo estrés salino, observando que en los tejidos de las plantas había acumulación de sodio y cloro, y una elevación de la proporción de sodio

con respecto a los demás cationes, catalogando por estas razones a la planta de Lulo como moderadamente tolerante a la salinidad por NaCl.

2.3 BASES TEÓRICAS

a) Proteínas y Estrés salino.

Las plantas responden a las condiciones de estrés reprogramando prácticamente todo su metabolismo, lo cual puede verse reflejado a nivel genómico, transcriptómico, proteómico y metabolómico. A nivel genómico, la tolerancia a la salinidad implica la presencia de genes únicos para la respuesta al estrés (genes que no se encuentran en especies susceptibles) o en todo caso a modificaciones en la estructura genómica, como duplicaciones de ciertos genes (así se aumentaría la dosis de expresión genética) o variaciones nucleotídicas en los genes o en sus promotores que generarían una diferencia de expresión en respuesta al estrés salino. A nivel transcriptómico, se aumenta la tasa de transcripción de ciertos genes, además de la necesidad de factores de transcripción especiales. A nivel proteómico, aumenta también la concentración de proteínas estructurales de respuesta a estrés (una de ellas es la osmotina) y la aparición de proteínas asociadas a la defensa contra el daño mecánico o por plaga. A nivel metabolómico, el estrés salino genera una presión para la adaptación de muchas vías metabólicas, sea para la producción de energía o para la protección contra el daño oxidativo consecuencia del estrés salino, así como para la activación de la síntesis de compuestos osmóticamente activos. Evidentemente, para la actividad a todos estos niveles, es necesario la participación de proteínas (factores de transcripción, proteínas de control osmótico y, sobre todo, enzimas que participan en la activación de vías de

señalización intracelular) lo que permite suponer que el contenido de proteínas sintetizadas en una planta expuesta a la salinidad debe ser diferente al de una planta que no se encuentra en estrés salino (Kosová y col., 2013).

Al igual que se asume que se deben activar la síntesis de muchas proteínas de respuesta al estrés, se debe considerar también que debe ocurrir inactivación de la expresión de otros genes, por lo que disminuiría también la síntesis de otros tipos de proteínas. Bajo condiciones de estrés salino, las actividades enzimáticas son afectadas y se perturban las vías metabólicas básicas, de tal forma que para mantener la homeostasis bajo el estrés, las plantas necesitan fortificar mecanismos de resistencia tales como transporte de iones, eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y síntesis de osmolitos, para lo cual también requieren una fuente extra de energía (Yan y col., 2005). En raíces de tomate por ejemplo, se ha mostrado activación de la síntesis de proteínas importantes para la glucólisis, ciclo del citrato, metabolismo de aminoácidos, biosíntesis de ATP, fotosíntesis, así como síntesis de proteínas relacionadas a la defensa y detoxificación (Manaa y col., 2013). Las plantas reducen el consumo de glucosa necesario para la síntesis de sacarosa y de esta forma proveen más glucosa a la vía glucolítica para obtener energía. Por tanto se espera una sobreexpresión de enzimas de la vía glucolítica, así como de la cadena respiratoria para permitir mayor síntesis de ATP (Yan y col., 2005).

En conclusión, las proteínas juegan un rol importante en la respuesta al estrés puesto que, debido a sus funciones estructurales y metabólicas, están envueltas directamente en la adquisición de la tolerancia.

b) Prolina y Estrés salino.

La prolina es un aminoácido sin carga a pH neutro y altamente soluble en el agua que se acumula en las células de las plantas durante el estrés osmótico a fin de aumentar la osmolaridad y manejar así el ingreso de agua y reducir su salida, favoreciendo así la turgencia necesaria para la expansión celular (Kavi Kishor y col., 2005). En bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* también hay acumulación de prolina y de otros solutos compatibles como la betaína durante el estrés osmótico (Liu y Zhu, 1997).

En plantas superiores, la síntesis de prolina se realiza a través de la vía del glutamato o la vía de la ornitina. Durante el estrés osmótico, la biosíntesis de prolina se da a través de la vía del glutamato. En esta vía, las dos primeras reacciones a partir del glutamato son catalizadas por la pirrolina 5-carboxilato sintetasa (P5CS), enzima reguladora de la vía. Se ha demostrado que la expresión del gen para esta enzima es inducida por estrés salino, deshidratación y ABA (Liu y Zhu, 1997), lo que significa que la acumulación de prolina durante el estrés salino se debe a una estimulación de la síntesis de novo junto con la represión de su catabolismo. Al igual que la P5CS, también se aumenta bajo estrés hídrico y salino la expresión de otros genes para enzimas de la vía de síntesis, como el de la pirrolina 5-carboxilato reductasa (P5CR) (Raymond y Smirnov, 2002). La acumulación de prolina libre ocurre también en diversos estados fisiológicos de la planta, como la floración y la formación de semillas, donde aparentemente sirve como una fuente de energía fácilmente accesible, ya que la oxidación de una molécula de prolina rinde 30 ATP (Kavi Kishor y col., 2005).

Aunque se considera que este aminoácido actúa principalmente como un soluto compatible, y por lo tanto con una función osmoreguladora inducida por deshidratación, otras funciones que cumpliría sería la estabilización de macromoléculas, disminución del exceso de compuestos reductores y un almacenamiento de carbono y nitrógeno para usarlo después de resolver el déficit hídrico (Raymond y Smirnoff, 2002), reducción de la denaturación enzimática debido al estrés salino o por calor (Kavi Kishor y col., 2005) y eliminación de radicales libres (Deivanai y col., 2011). Al igual que la glicina betaína, la prolina protege las reacciones fotosintéticas estabilizando la estructura de las proteínas extrínsecas del complejo fotosintético II, la síntesis de ATP y la activación de enzimas (Chaman y col., 2014) y al parecer participa en la formación de la capa de hidratación que rodea a los fosfolípidos, favoreciendo la interacción que se genera entre sus cabezas polares (Kavi Kishor y col., 2005).

La biosíntesis de prolina media en el aumento de la proporción $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, lo cual a su vez favorece la actividad de la vía de las Pentosas que genera eritrosa 4-fosfato, la cual a su vez permite la síntesis de fenilpropanoides o metabolitos secundarios que se acumulan durante el estrés. Esto a su vez genera cambios en las propiedades físicas de la pared celular y acumulación de ligninas. Además, la activación de la vía de las Pentosas favorece la síntesis de nucleótidos, lo que activaría la división celular luego de mejorar el estrés (Kavi Kishor y col., 2005). La actividad de la vía de las pentosas está relacionada con la síntesis de ácidos grasos y por tanto de lípidos en general. Todo esto podría significar que el estrés salino produce (quizá a través de alguna señal mediada por prolina) la activación genética de la vía de las pentosas, por ejemplo a nivel

de la expresión del gen para la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima que cataliza el primer sitio de generación de NADPH y que es el principal punto de control de toda la vía (Nemoto y Sasakuma, 2000).

c) Metabolismo de Azúcares y estrés salino.

Dentro de todos los efectos sobre la fisiología de las plantas, el estrés salino genera la acumulación de diversos compuestos en altas concentraciones para de esa forma atenuar el efecto del desequilibrio osmótico producido por la sal, de ahí que se les conozca como compuestos osmóticamente activos y, como no interfieren con el metabolismo celular (o sea son compatibles con el mismo) también son conocidos simplemente como compuestos o solutos compatibles (Williamson y col., 2002). Dentro de estos compuestos, podemos encontrar a los azúcares simples (principalmente fructosa y glucosa), los alcoholes de azúcares (glicerol e inositoles metilados) y a los azúcares complejos (trehalosa, rafinosa y fructanos) (Jouyban, 2012).

Durante la fotosíntesis, los productos formados salen del cloroplasto como triosa fosfatos para lograr ser condensados en hexosas y luego convertirlos en sacarosa, la que a su vez será exportada a los tejidos consumidores ("sink tissues"; Heyer, 2000). Los polioles de azúcares también son una importante forma circulante en la planta (se transporta así hasta un 30% de todo el carbono fotosintéticamente fijado en la planta). Los polioles más comunes poseen seis carbonos, como el sorbitol, manitol y el galactitol. En las células, estos compuestos actúan como osmoprotectores gracias a sus grupos hidroxilo que permiten generar una esfera de hidratación alrededor de las macromoléculas,

previniendo la inactivación metabólica en condiciones de bajo potencial osmótico.

De todos los polioles, el manitol (proveniente de la reducción de la manosa) es quizá el de mayor distribución en plantas superiores, bacterias y hongos. Normalmente, el manitol es sintetizado por el parénquima en palizada de las hojas maduras y es translocado hacia los tejidos consumidores para su utilización en el ciclo del citrato y para la producción de energía. Durante el estrés salino, el ingreso del manitol al ciclo del citrato es inhibido, por lo que se genera un aumento de los niveles de manitol dentro de la planta (en igual magnitud, tanto en el citoplasma como en cloroplastos) para ser usado como agente osmoprotector (sobre todo en cloroplastos), mientras que se usa sacarosa para la asimilación y el crecimiento. Sólo en el caso que los niveles de sacarosa y azúcares libres disminuya (por ejemplo, en meristemas de raíz y brotes), se vuelve a activar la utilización de manitol como fuente de energía (Williamson y col., 2002).

Los carbohidratos quedan almacenados en las plantas bajo la forma de almidón, que puede contener cadenas de cerca de 1000 residuos de glucosa llamadas amilosa (con enlaces α -1,4) y polímeros ramificados con aproximadamente 25 – 50 glucosas entre enlaces α -1,6 (Addai y Scott, 2011). El almidón es producido a partir del exceso de azúcar generado durante la fotosíntesis (Krasensky y Jonak, 2012).

La biosíntesis de almidón ocurre en plástidos de células fotosintéticas y no fotosintéticas. En el cloroplasto, se degrada el almidón para convertirlo en sacarosa (vía hidrolítica) o para degradarlo para producir energía (vía

fosforolítica) (Boriboonkaset y col., 2012). La α -amilasa y la ADP-glucosa pirofosforilasa son las principales enzimas en la degradación y la síntesis de almidón, respectivamente. La ADP-glucosa pirofosforilasa es la enzima reguladora de la vía de síntesis de almidón, produciendo ADP-glucosa para que sea utilizada por la enzima almidón sintasa y para la enzima ramificadora del almidón. Las plantas tienen también otras enzimas hidrolíticas como la β -amilasa (una exoamilasa que rompe los enlaces α -1,4 glucosídicos de los extremos no reductores del almidón liberando maltosa y produciendo dextrina β -límite), la α -amilasa (endoamilasa responsable para degradar los enlaces glucosídicos no terminales para producir glucosa, maltosa, maltotriosa y oligosacáridos ramificados) y la α -glucosidasa (rompe maltosa y otros oligosacáridos para liberar glucosa) (Almodares y col, 2008). La fosforilasa del almidón también hidroliza el almidón generando glucosa-1-fosfato y fosfato inorgánico (Addai y Scott, 2011).

En general, un bajo contenido de azúcar activa la fotosíntesis, la movilización de reservas y la exportación, mientras que la presencia abundante de azúcares promueve el crecimiento y el almacenamiento de carbohidratos (Gupta y Kaur, 2005). A medida que aumenta la concentración de sal, el contenido de sacarosa disminuye mientras que el de glucosa y fructosa aumenta. Esta reducción parece deberse al aumento de la actividad invertasa. Parece ser que en las hojas, las altas concentraciones de sal indican una mayor necesidad de hexosas, sustratos necesarios para procesos respiratorios. En plantas expuestas a mayores concentraciones de sal, se ha observado una baja actividad de glucosa quinasa (GK), glucosa fosfato isomerasa (GPI) y piruvato quinasa (PK), las tres enzimas con rol importante en la regulación de la glucólisis. Esto produce como

efecto una acumulación de hexosas, lo que ayuda a explicar la producción más baja de biomasa en condiciones de estrés salino (Almodares y col, 2008) ya que, bajo estas condiciones, la competencia entre diferentes procesos fisiológicos y los órganos consumidores (“sink tissues”) respecto a las fuentes de carbono afecta significativamente el crecimiento total de la planta y el rendimiento de la producción (Lu y col., 2010). Esto se ve sobre todo durante el desarrollo temprano de los cultivos, donde una mayor acumulación de azúcares puede reflejar condiciones no deseables de crecimiento, lo que resulta en una detención reversible del desarrollo como un mecanismo de protección (Gupta y Kaur, 2005).

Los azúcares solubles juegan un rol clave no solo en la osmoregulación, incluyendo el control del potencial hídrico y osmótico, sino también en la detoxificación como agentes quelantes para unir el Na^+ con los gránulos de almidón (Boriboonkaset y col., 2012). También sirven como inductores de genes de respuesta a estrés, principalmente la glucosa. Existen en las células vegetales sensores de azúcares, los cuales generan una señal que inicia cascadas de transducción de señales para generar como respuesta la expresión alterada de diversos genes y actividades enzimáticas. Hay dos mecanismos sensores de hexosas, uno dependiente de la actividad de la hexoquinasa (involucrando azúcares fosforilados) y el otro independiente de la actividad de esta enzima (sensores de azúcares *per se*). La actividad hexoquinasa es el sensor para mediar la señal de represión, por ejemplo del metabolismo fotosintético (inhibición de la RubisCo) (Gupta y Kaur, 2005). Por ejemplo, uno de los genes tempranos en trigo que responden a la salinidad luego de 2 horas de exposición a 0,15 M de NaCl parece ser la glucosa 6-P-Deshidrogenasa

(G6PDH), enzima clave de la vía de las pentosas-fosfato, cuya principal función es la de proveer a la célula de NADPH y otros intermediarios, tales como pentosas y eritrosa 4-fosfato. Se considera que por lo menos existen dos isoformas de esta enzima, una en el citoplasma y otra en el estroma del cloroplasto.

El estrés salino y no el osmótico permite activar la transcripción de secuencias muy similares a la de G6PDH (Nemoto y Sasakuma, 2000). Existen otras vías de señalización que permiten lograr un estado de adaptación y/o tolerancia al estrés salino, tales como la de la calmodulina y la calcineurina junto con el calcio (una vía usada en plantas y levaduras), o las vías dependientes o independientes de ácido abscísico o ABA (Oh y col., 2011). El nivel de ABA aumenta como resultado del estrés salino y la inoculación exógena de ABA acelera la adaptación de cultivos celulares en estrés salino o en estrés por frío, lo que implica el rol del ABA en la adaptación al estrés osmótico (Nemoto y Sasakuma, 2000).

d) Fotosíntesis y estrés salino.

Durante el estrés salino, en la planta ocurrirá un aumento del costo de energía debido a una menor captación de agua y a la toxicidad del sodio y cloro en las células en crecimiento de las yemas o brotes, lo que va a producir una reducción en el crecimiento total de la planta, lo que producirá a su vez una menor área foliar y la consecuente disminución de la fotosíntesis (Almodares y col, 2008). El estrés salino genera también un estrés hídrico, el cual producirá un cierre de estomas como efecto temprano y progresivo (Flexas y Medrano, 2002). El cierre estomático tiene como objetivo reducir la transpiración y parece ser la principal

causa de la disminución de la tasa fotosintética (Pattanagul y Thitisaksakul, 2008) y por tanto a la disminución del crecimiento de la planta (Turan y col., 2009).

La tasa fotosintética de las hojas disminuye en plantas C3 y C4 a medida que disminuye el contenido hídrico relativo y el potencial hídrico. Por esto se puede observar que la tasa de fotosíntesis usualmente es más baja en plantas expuestas a la salinidad y especialmente al NaCl (Turan y col., 2009). Condiciones ambientales que generan concentración intracelular de iones Na^+ , K^+ y Cl^- llevan a la inactivación irreversible de los fotosistemas PSI y PSII (debido al cierre estomático inducido por el estrés osmótico y la acumulación de sal) e incluso inactivación de la cadena de transporte de electrones. Es importante resaltar la inactivación de PSII, ya que este fotosistema está asociado a la asimilación de CO_2 (De Lucena y col., 2012; Jamil y Rha, 2013; Santos, 2004). La síntesis disminuida de ATP es considerada como el efecto primario de la disminución del contenido hídrico relativo debido principalmnte, pero no de manera exclusiva, a los efectos de aumentar las concentraciones de iones (específicamente Mg^{+2}) en el cloroplasto a medida que cae el contenido hídrico (Lawlor, 2002).

A medida que el potencial hídrico relativo declina, la disminución relativa de la asimilación de CO_2 por la conductancia estomática disminuye, y aumenta la limitación metabólica. Una limitada fijación del CO_2 debido al estrés lleva a una disminución en la reducción del carbono por el ciclo de Calvin y una disminución de los niveles de NADP^+ oxidada para servir como aceptor de electrones en la fotosíntesis (Amirjani, 2010). La limitación de la síntesis de ribulosa bifosfato es la causa probable de un potencial fotosintético disminuido en un bajo contenido

hídrico y no la inhibición o pérdida de las enzimas del ciclo de reducción fotosintética del carbono, incluyendo la RubisCo. La limitación de la síntesis de ribulosa bifosfato probablemente es causada por la inhibición de la síntesis de ATP debido a la inactivación progresiva o pérdida del Factor Acoplante (o ATP sintasa) que resulta en un aumento de la concentración iónica de Mg^{+2} y no a la capacidad reducida para el transporte de electrones o protones, o a una inadecuada gradiente de protones trans-tilacoide (ΔpH) (Lawlor, 2002).

También se puede considerar que la disminución de las funciones fotosintéticas en las plantas en estrés salino puede deberse a la disminución del contenido de clorofila en la planta debido a varios factores. En primer lugar, puede deberse a la degradación de las clorofilas por acción de la enzima clorofilasa, enzima que remueve el fitol de la estructura del pigmento (Santos, 2004). Por otro lado, el estrés salino en muchos casos causa inhibición de la síntesis del pigmento a partir del ácido glutámico, a partir del cual se sintetiza el ácido aminolevulínico (ALA), precursor de la síntesis de los tetrapirroles (Santos, 2004). Esto puede deberse al estrés hídrico que se genera, ya que se ha observado que el calor, el frío o la sequía causan una subregulación de la expresión de los genes para las enzimas de la vía de síntesis de clorofila, o una modificación post-traducciona l de dichas enzimas (Turan y Tripathy, 2015). Finalmente, la reducción del contenido de clorofila puede generarse por acción del daño oxidativo. La literatura muestra que las especies reactivas de oxígeno causan degradación directa de clorofila (Jaleel y col., 2008) y lipoperoxidación a nivel de membrana, lo que disminuye la fluidez y selectividad de la membrana (Sevengor y col., 2011). Por esa razón, la pérdida de clorofila, la lipoperoxidación medida como contenido de malondialdehído, y una pérdida de electrolitos son considerados

como indicadores de daño oxidativo (Yasar y col., 2008). Se ha reportado que el estrés salino induce una reducción en el número de cloroplastos, los cuales tienen los tilacoides y la membrana de la organela con algo de degradación, algo que se puede observar también durante el proceso de senescencia y lo que sería responsable para la disminución de la actividad de la clorofilasa (Santos, 2004).

e) Metabolismo de lípidos y estrés salino.

Las funciones que cumplen los lípidos en las plantas son variadas: sirven principalmente para la biogénesis de membrana, algunos sirven como moléculas de señal y principalmente sirven como una forma de almacenar carbono y energía. La síntesis de lípidos es una vía metabólica muy dinámica y que está estrechamente relacionada con los procesos adaptativos. Por ejemplo, los tejidos blandos y la corteza tienen lípidos protectores distintivos que ayudan a prevenir la desecación y la infección (Schmid y Ohlrogge, 2002).

Hay diferentes factores ambientales que pueden afectar la biosíntesis de lípidos, como la luz, temperatura, estrés hídrico, constituyentes del suelo y de la atmósfera, así como el daño físico y por patógenos (García, 2010). Se considera que las plantas usan a los lípidos (sobre todo triglicéridos) como almacenes de carbono más que como reserva de energía, principalmente en las semillas y en algunos frutos (como la palta y aceituna). Considerar a los lípidos como almacén de carbono está relacionado a la capacidad de sintetizar sacarosa a partir de los lípidos a fin de que pueda ser transportada de manera más rápida a otros tejidos de la planta. Esta transformación de lípidos en sacarosa envuelve varios compartimentos celulares, tales como los oleosomas, glioxisomas, mitocondria y citoplasma (Ohlrogge y Browse, 1995).

En plantas, la síntesis de ácidos grasos está activa prácticamente en todo tipo celular ya que es muy importante para el crecimiento de la planta. La síntesis ocurre en cloroplasto y otros plastidios (Schmid y Ohlrogge, 2002) generando como productos finales los ácidos palmítico (16 C) y esteárico (18 C). De aquí, los ácidos grasos son movilizados a diferentes compartimentos celulares a fin de seguir su metabolismo. Por ejemplo, la desaturación de los ácidos grasos ocurre a nivel de retículo endoplásmico (García, 2010).

Los principales ácidos grasos presentes en las plantas tienen 16 y 18 carbonos, conteniendo de 1 a 3 enlaces dobles de tipo cis. Cinco ácidos grasos (18:1, 18:2, 18:3, 16:0 y en algunas especies, 16:3) componen cerca del 90% de las cadenas de ácidos grasos presentes en los glicerolípidos de prácticamente todas las membranas de la planta (Ohlrogge y Browse, 1995). De estos ácidos grasos, el oleato (18:1 Δ 9), linoleato (18:2 Δ 9,12), y α -linolenato (18:3 Δ 9,12,15) representan cerca del 85% de los ácidos grasos en la membrana y cerca del 80% en los aceites de almacenamiento (Yu y col., 2011).

Los ácidos grasos son utilizados para generar los llamados lípidos acílicos: triglicéridos, fosfolípidos y glucolípidos, los que se distribuyen de manera particular en la célula vegetal. Se considera por ejemplo que la bicapa lipídica de los cloroplastos principalmente está compuesta de galactolípidos más que de fosfolípidos. Como consecuencia, los galactolípidos son los lípidos acílicos predominantes en los tejidos verdes (Schmid y Ohlrogge, 2002).

La síntesis de los lípidos acílicos también ocurre en diferentes compartimentos. En el cloroplasto ocurre la síntesis del ácido fosfatídico (vía procariótica), mientras que en el retículo endoplásmico están presentes las acil-transferasas

que agregan los ácidos grasos (vía eucariótica) para la síntesis de fosfolípidos, galactolípidos y triglicéridos (García, 2010).

La biosíntesis de triglicéridos también ocurre en plástidos, mitocondrias y sistemas de endomembranas, con una vía independiente en cada compartimento (Yu y col., 2011). Los triglicéridos se almacenan principalmente en semillas dentro de los cuerpos lipídicos, también llamados oleosomas, cuerpos de aceite o esferosomas (Chapman y col., 2012). Estos cuerpos se encuentran en mayor cantidad (más de mil en algunas semillas) que las gotas de grasa que se podrían observar en una célula animal (muy pocas, incluso sólo una). Los cuerpos lipídicos parecen estar rodeados por una especie de membrana que contiene fosfolípidos y proteínas llamadas oleosinas (estabilizan la estructura del cuerpo lipídico aparentemente como lo hacen las apolipoproteínas en animales) y caleosinas (proteínas asociadas al calcio) (Schmid y Ohlrogge, 2002). El origen de los oleosomas es el retículo endoplásmico, de donde emergen a manera de una yema debido a que en medio de la bicapa del retículo se almacenan los triglicéridos que van a ser contenidos dentro (Chapman y col., 2012).

La caracterización de las proteínas asociadas a estas gotas de lípidos (oleosinas, caleosinas y esteroles deshidrogenasas o esteroleosinas) permiten sugerir que las gotas de lípidos cumplen un rol importante en las respuestas al estrés, vías de señalización hormonal, y varios aspectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las caleosinas actúan a manera de peroxigenasas que catalizan la oxigenación dependiente de hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados para producir epóxidos de ácidos grasos, lo que ocurre durante la respuesta a estrés. Estas proteínas son sensibles al calcio (de ahí su nombre) en cuanto a su

capacidad de unirse a la superficie del oleosoma, así como a su actividad peroxigenasa dependiente del calcio.

Existen 5 genes para caleosinas, pero sólo el gen AtCLO-1 se expresa en mayor grado en semillas, mientras que los otros genes se expresan a niveles muy bajos en toda la planta, pero cuando se coloca a la planta en condiciones de estrés hídrico, hay una fuerte expresión temprana de AtCLO-3, también conocido como RD20 (gen 20 de respuesta a la deshidratación), cuyo producto ha sido localizado en células vegetativas. AtCLO-4 es también un mediador de la respuesta integral de la planta a diversos tipos de estrés, como el estrés hídrico, salino y el osmótico. Las esteroleosinas son esterol deshidrogenasas que juegan un rol importante en el metabolismo y activación de brasinosteroides, hormonas que cumplen roles importantes en el crecimiento, desarrollo, fertilidad y respuesta a estrés (Chapman y col., 2012).

Los cuerpos lipídicos tienen aproximadamente tienen 0,2 a 2.5 μm de diámetro y no sólo se producen y almacenan en semillas, se considera que se encuentran en el citoplasma de muchos si no todos los tejidos de una planta, e incluso dentro de los plástidos se han encontrado cuerpos similares denominados plastoglóbulos, conteniendo triglicéridos, metabolitos derivados de isoprenoides y proteínas (Yu y col., 2011).

Prácticamente, en las plantas no se produce colesterol al mismo nivel que en las células animales. Sin embargo, otros esteroides, principalmente el sitosterol y el estigmasterol, están presentes en proporciones importantes dentro del contenido de lípidos en plantas, cumpliendo posiblemente una función similar a la del colesterol, sobre todo en cuanto a la regulación de la fluidez de la membrana. El

sitosterol, el esteroles más común en plantas (Schmid y Ohlrogge, 2002), es un regulador muy eficiente de la fluidez de la membrana celular y la permeabilidad hídrica, mientras que el estigmasterol es inefectivo para ambas funciones. En diversas especies, se ha reportado que en estrés salino, ocurre un aumento del contenido de estigmasterol mientras que disminuía el contenido de sitosterol (López-Pérez y col., 2009).

Los esteroides libres pueden jugar un rol definitivo en la exclusión de iones a través de sus efectos sobre la fluidez y la permeabilidad de la membrana: una mayor rigidez de la membrana podría evitar el flujo de Na^+ y Cl^- en las células. Los esteroides son capaces también de modular la actividad de proteínas transportadoras en la membrana, tales como H^+/ATPasa y sistemas antiporter Na^+/H^+ conocidos como moduladores del estrés salino (López-Pérez y col., 2009).

Los esteroides también cumplen roles hormonales. Por ejemplo, los brasinosteroides son fitohormonas que influyen en el crecimiento, germinación de la semilla, rizogénesis, senescencia y abscisión de la hoja, así como en la respuesta al estrés ambiental. En este último caso, el mecanismo es la activación o supresión de reacciones enzimáticas claves, inducción de la síntesis proteica y la producción de varios compuestos químicos de defensa (Javid y col., 2011).

En muchas plantas, cambios en los lípidos de membrana plasmática, tales como esteroides y ácidos grasos, han sido observados como resultado del estrés salino y pueden contribuir al control de la fluidez y permeabilidad de la membrana como mecanismos de adaptación a estrés. Se ha reportado en plantas con estrés

salino una disminución de la insaturación de ácidos grasos junto con un aumento de sitosterol, eficiente componente en reducir la permeabilidad al agua de las membranas. Por tanto, se esperaría una disminución de sitosterol y un aumento en la actividad de insaturación de ácidos grasos si la planta es tolerante a la salinidad (López-Pérez y col., 2009).

f) Minerales y Estrés Salino.

La base fundamental de la adaptación al estrés salino es el control del transporte de sales a nivel del plasmalema y el tonoplasto y su compartimentalización en los diferentes órganos de la planta. La concentración de sales en el suelo genera un potencial hídrico negativo y una reducción del potencial osmótico, lo que reduce la captación de agua por la planta, generando pérdida de la rigidez de los tejidos y una disminución del potencial osmótico citoplasmático, lo cual es la primera respuesta al estrés salino (Casierra y col., 2000).

La epidermis radicular es el primer tejido que entra en contacto con la sal y por tanto el primero en recibir los cambios osmóticos e iónicos en las células y de disparar los mecanismos de respuesta. Estos mecanismos incluyen: (i) la salida de agua de la célula debido al gradiente osmótico; (ii) la reducción de la disposición de K^+ en las raíces debido a la reducida actividad de este catión en la solución del suelo; (iii) el incremento de la salida de K^+ a través de canales selectivos y no selectivos; y (iv) la propagación de estos eventos iónicos generados en la membrana plasmática de la epidermis de la raíz hacia organelas intracelulares (vacuola principalmente) y hacia otros tejidos de la planta (Zepeda, 2010). En muchos casos, la principal respuesta que se genera en las glicofitas será la exclusión de iones, principalmente el sodio, primero a nivel de la raíz

hacia los diferentes órganos, permitiendo que las plantas toleren concentraciones extracelulares muy elevadas de sales, sobre todo el sodio (Reyes y col., 2008).

Los daños causados por el exceso de sodio son (i) la interrupción del equilibrio iónico (facilitando el influjo de cloruro en contra del gradiente químico); (ii) toxicidad celular (con efecto deletéreo sobre la actividad de algunas enzimas); (iii) reducción de la fotosíntesis e incremento de especies reactivas de oxígeno; y (iv) un desbalance osmótico, desorganización de la membrana, reducción del crecimiento e inhibición de la división y expansión celular (Chávez y González, 2009). También se genera deficiencia de otros nutrientes en el suelo debido a la alta concentración de sodio interactuando con otros factores ambientales tales como la sequedad, lo que exacerba los síntomas.

Los altos niveles de sodio desequilibran la captación de otros nutrientes (1) interfiriendo con los transportadores en la membrana plasmática de la raíz, tales como los canales selectivos de potasio, y (2) la reducción del crecimiento de la raíz, lo que disminuye la captación de agua, nutrientes limitantes del crecimiento (fósforo, hierro o zinc) y el crecimiento de microorganismos del suelo, como las micorrizas (Parvaiz y Satyawati, 2008).

La toxicidad iónica es un factor agravante de los síntomas generados por el estrés salino, más que un estrés meramente osmótico. Procesos como la germinación, crecimiento, rendimiento, floración y fructificación son afectados por altas concentraciones de sales. La citotoxicidad iónica se da principalmente por el reemplazo del potasio por el sodio en las reacciones bioquímicas normales así como por cambios conformacionales y pérdida de la función de proteínas,

afectando todo el metabolismo y provocando a la vez un estrés oxidativo (Zepeda, 2010).

Una manera de estudiar el efecto de la acumulación de sodio sobre el metabolismo de otros minerales es a través de cocientes tipo Na/Ca, Na/K, Na/Mg e incluso Na/(Ca+K+Mg). En el estrés salino, estas proporciones aumentan mucho más, lo que implica un desplazamiento de los elementos en relación al sodio. Por ejemplo, la relación Na/K en los cloroplastos normalmente es igual a 5 mientras que en estrés salino es mucho mayor. El valor aumentado de estas proporciones sugiere que se deben presentar síntomas debido a carencias de estos elementos. Por último, los valores van a depender de la especie de planta estudiada, del órgano analizado o incluso de los niveles de salinidad en el medio. Por ejemplo, en raíz el contenido de potasio disminuye a 30 mM y aumenta a 60 mM con respecto al control, mientras que en tallo y hojas disminuye (Casierra y col., 2000).

Quizá el potasio es el elemento más sensible al estrés salino, por lo que el mantenimiento de la homeostasis de Na⁺ y K⁺ es vital para las células vegetales. Se necesita mantener elevadas las concentraciones de potasio (entre 100 y 200 mM) para permitir que se realicen adecuadamente las funciones metabólicas. El problema es que la captación de potasio se ve disminuida por el sodio debido a la semejanza química de ambos iones (Chávez y González, 2009). Las funciones del potasio son: (i) mantener el balance osmótico; (ii) participar en los procesos de cierre y apertura estomática (Chávez y González, 2009); (iii) ser cofactor enzimático, por lo que es considerado como un elemento activador de más de 50 enzimas, por ejemplo de la piruvato quinasa; (iv) favorecer la unión de los RNAt a los ribosomas, por lo que es crucial para la síntesis de proteínas

(Parvaiz y Satyawati, 2008); y (iv) mantener la turgencia celular (Netondo y col., 2004).

El calcio cumple roles de señalización celular, de estructura a nivel de la membrana y de regulador de la actividad de algunos transportadores iónicos. Puede disminuir la magnitud del efecto de la salinidad sobre el crecimiento de la planta, quizá debido a su rol estabilizador de la estructura de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva. También el calcio extracelular puede reducir la pérdida de potasio inhibiendo los canales rectificadores de salida de potasio (KORC), así como disminuir la entrada de sodio inhibiendo los canales rectificadores de ingreso de potasio (KIRC) y sobre todo los canales independientes de voltaje (VIC) a nivel del plasmalema. También se ha visto que este elemento regula la selectividad del paso K/Na en condiciones salinas a través de otros transportadores iónicos como el SOS1 (antiporte Na^+/H^+ del plasmalema de *Arabidopsis*) (Chávez y González, 2009).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación es de naturaleza aplicada y de tipo experimental, debido a que se manipularon las concentraciones de sal en la solución de riego a fin de crear una condición de estrés salino y poder comparar los contenidos de diversos compuestos y minerales con los de cultivos mantenidos en condiciones normales.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El presente trabajo se realizó utilizando semillas y plantas de tomate comercial, *Lycopersicon esculentum* Mill, cv. Río Grande, en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal, y en un invernadero particular en el distrito de San Juan de Lurigancho.

3.3 OBTENCIÓN DE CULTIVOS SEMIHIDROPÓNICOS DE TOMATE

Se desarrollaron tres Experimentos con cultivos semihidropónicos de tomate (Anexo I):

a) **Experimento 1:** Para determinar la concentración mínima considerada como estresante por salinidad, un primer grupo de plantas fueron cultivadas en bandejas de poliestireno expandido (tecnopor) con 25 plantas por bandeja y con arena desinfectada como sustrato, en los ambientes del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal (Distrito de El Agustino, Figura 13 en Anexo II) a una temperatura ambiental de $\pm 20^{\circ}\text{C}$, 70% de Humedad Relativa y un fotoperiodo de 12 horas con luz natural. Las bandejas fueron agrupadas en bloques, regadas por capilaridad con solución hidropónica comercial para tomate (a la que se denominó Solución Normal según Díaz y Salas, 2007) (Figura 14, Anexo II) a la que se le agregó NaCl hasta obtener concentraciones finales de 0 mM, 40 mM, 85 mM, y 100 mM. A los 30 días de cultivo se tomaron todas las plantas de los bloques, seccionándolas en hojas, tallo y raíz. Se homogenizaron estas muestras en un mortero usando agua destilada como solvente y se les procedió a determinar la concentración de azúcares reductores, almidón, proteínas, prolina y lípidos totales, triglicéridos y esteroides. También se tomaron muestras de hojas, tallo y raíz secándolas en estufa a 60°C por 1 semana y luego fueron molidas en un mortero para obtener ceniza con el uso de una mufla, para su posterior determinación del contenido de sodio, calcio, magnesio y potasio.

b) **Experimento 2:** Se mantuvieron cultivos semihidropónicos de tomate entre los meses de Abril a Agosto (130 días en total) en un invernadero particular en la Urbanización Azcarrunz Alto, San Juan de Lurigancho a una temperatura de $20 - 22^{\circ}\text{C}$, un 70 – 80% de Humedad Relativa y un fotoperiodo promedio de 8 horas de luz natural (Figura 15, Anexo II). Las

plantas fueron cultivadas en baldes con arena como sustrato y se regaron por inundación usando Solución Normal para un grupo de 45 plantas, y Medio Hidropónico comercial con 85 mM de NaCl (a la que se denominó Solución Salina según Díaz y Salas, 2007) para otro grupo de 45 plantas. Se tomaron muestras de plantas a los 35, 70, 105 y 130 días de cultivo, seccionando las hojas (y separándolas como Hojas superiores, medias e inferiores), tallo y raíz para procesar estas muestras y determinar su contenido de sodio, calcio, magnesio y potasio. Así mismo, a los 70 días (primera cosecha), a los 105 días (segunda cosecha) y, para algunas determinaciones, a los 130 días (tercera cosecha), se tomaron muestras de frutos maduros (determinado por el color rojo intenso; Rodrigo, 1999), los cuales fueron homogenizados para cuantificar azúcares reductores, pH, conductividad y contenido de minerales.

- c) **Experimento 3:** Un tercer grupo de plantas de tomate (25 por cada bandeja de tecnopor) fueron mantenidas en las mismas condiciones descritas en el Experimento 1, separadas en dos bloques, el primero regado con Solución Normal y el segundo con Solución Salina. Se tomaron aleatoriamente muestras de 10 plantas a los 48, 52, 55, 61 y 66 días del cultivo, con la salvedad que a las plantas que se regaban con Solución Salina se les mantuvo por 24 horas en agua destilada en el día 60 (a fin de disminuir rápidamente la sal captada por las plantas y la arena de esas bandejas), luego del cual fueron regadas con Solución Normal hasta el día 66. En cada toma de plantas se separaron las hojas y tallos, procesándolas para la obtención de su contenido de sodio, calcio, magnesio y potasio.

Todas las determinaciones descritas fueron realizadas por triplicado y analizadas estadísticamente siguiendo un diseño completo al azar con arreglo factorial.

3.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.4.1 Cuantificación de proteínas, usando el micrométodo de Bradford (Bradford, 1976): Se homogenizaron 0,5 g de cada muestra en 1 mL de búffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 al cual se le adicionaron 160 μ L de PMSF disuelto en etanol al 70% como inhibidor de proteasas. Se tomaron 25 μ L de cada homogenizado, se agregaron 75 mL del buffer fosfato para finalmente adicionar 1 mL de reactivo de Bradford. Luego se agitaron las muestras fuertemente, se les dejó reposar por 5 minutos, luego de los cuales se realizó la lectura de la absorbancia a 595 nm. Con el uso de una curva de calibración y con el valor correspondiente del porcentaje de Materia Seca para cada muestra, se calculó la concentración de proteínas expresadas en μ g de proteína/g de peso seco.

3.4.2 Cuantificación de prolina (Bates y col., 1973): Se tomaron 0,25 g de cada muestra y se homogenizaron en 5 mL de ácido sulfosalicílico al 3%. Luego se mezclaron 2 mL del homogenizado y 2 mL del reactivo ninhidrina ácida. Se colocó esta mezcla en baño maría hirviendo por una hora; se enfrió rápidamente y se agregaron 4 mL de tolueno, obteniéndose las absorbancias a 520 nm. Las concentraciones (en mg de prolina/g de cada muestra) se hallaron utilizando una curva de calibración y el peso seco de cada muestra.

3.4.3 Cuantificación de azúcares reductores mediante el método de Somogyi-Nelson (Falen, 1982): Se homogenizaron 0,5 g de cada muestra en 1 mL de búffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,0 al cual se le adicionaron 160 μ L de PMSF disuelto en etanol al 70% como inhibidor de proteasas; se tomaron 100

μL de cada homogenizado, a los cuales se agregaron 0,7 mL de agua destilada, 100 μL de hidróxido de Bario y 100 μL de sulfato de Zinc. Se agitaron los tubos y se dejaron en reposo por 5 minutos, centrifugándose luego a 3000 rpm por 15 minutos. Se tomaron 0,5 mL de cada sobrenadante (desproteínizado diluido 1:10) y se les agregó 0,5 mL de reactivo cúprico alcalino, llevándose a baño maría hirviente por 20 minutos. Los tubos fueron enfriados rápidamente para agregarles seguidamente 1 mL de reactivo arseno–molíbdeno, agitándose hasta que cesara la producción de gas. Finalmente se agregó agua destilada hasta completar los 5 mL y se dejó reposar por 10 minutos, luego de los cuales se realizó la lectura de las absorbancias a 520 nm. El cálculo de la concentración de azúcares se realizó gracias a la preparación de una curva de calibración y, gracias a la determinación previa del peso seco de las muestras, reportándose los resultados finales como μg de azúcar/g de peso seco.

3.4.4 Cuantificación de almidón, usando la reacción cuantitativa de lugol (Salas y col., 1999): Se homogenizaron 0,5 g de cada muestra en 1 mL de búffer fosfato 0,1 M pH 7,0 al cual se le adicionaron 160 μL de PMSF disuelto en etanol al 70% como inhibidor de proteasas; se tomaron 100 μL de cada homogenizado y se les agregó 100 μL del reactivo de lodo (lugol) perteneciente al kit de determinación de amilasa (Wiener, 1990). Se agregaron 800 μL de agua destilada a cada tubo, se mezcló y se dejó reposar unos minutos antes de leer la Absorbancia a 440 nm. Para obtener los resultados finales (en μg de almidón/g de peso seco), se desarrolló una curva de calibración y se determinaron los pesos secos de cada muestra.

3.4.5 Cuantificación de clorofilas (Arnon, 1949): Se tomaron 0,1 gramos de muestra de hojas de cada tratamiento, y se homogenizaron en un mortero utilizando como solvente 10 mL de acetona al 80%. Se filtró el homogenizado, y el filtrado fue colocado en tubos de vidrio; luego se utilizó un espectrofotómetro para realizar las lecturas de absorbancia de cada tubo a 663 nm y 645 nm de longitud de onda, usando en cada caso un tubo con 10 mL de acetona al 80% como blanco. Estas lecturas permitieron calcular el contenido de clorofila a y clorofila b de cada tubo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl a (mg / g de hoja)} = \frac{((12,7 \times A_{663}) - (2,6 \times A_{645})) \times \text{mL de acetona}}{\text{mg de hoja}}$$

$$\text{Chl b (mg / g de hoja)} = \frac{((22,9 \times A_{645}) - 4,68 \times A_{663})) \times \text{mL de acetona}}{\text{mg de hoja}}$$

$$\text{Total Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

3.4.6 Determinación de lípidos: Se tomaron aproximadamente 1,5 gramos de cada muestra y se secaron en una estufa a 60° C aproximadamente por 4 días. Estas muestras completamente secas fueron colocadas en cartuchos de papel filtro y fueron colocadas dentro de un balón, parte del equipo extractor Soxhlet, teniendo en cuenta las indicaciones de López-Mesas y Crespi (2000). El solvente utilizado fue cloroformo y cada extracción duró un total de 4 horas, luego de las cuales se retiraron los cartuchos del balón, y los extractos obtenidos fueron resuspendidos con 5 mL de cloroformo fresco para su posterior almacenamiento a 4°C. Con estos extractos se procedió a realizar las siguientes determinaciones:

a) **Contenido de lípidos totales según el método de la fosfovainillina**

(Wiener, 1990): Se tomaron 50 μL de los extractos clorofórmicos y se les agregó 1 mL de ácido sulfurico concentrado. Se agitaron y se dejaron en baño maría hirviente por 10 minutos. De cada tubo se tomaron 100 μL y se agregaron 2,5 mL de reactivo fosfovainillina, se agitaron los tubos y se dejaron en baño maría a 37°C por 10 minutos, luego de los cuales se dejaron enfriar y se procedió a realizar la lectura de Absorbancia a 530 nm. La concentración fue calculada a partir de la comparación de lecturas con las de un standard de derivados etoxilados, equivalente a 10 g/L de lípidos totales. Los resultados son reportados como mg de lípidos/mL de extracto.

b) **Contenido de triglicéridos según el método colorimétrico (Wiener, 1990):**

A 50 μL de los extractos clorofórmicos se les agregó 400 μL de una solución extractante que contenía una mezcla de ácido sulfurico 0,15 N y nonano/iso propanol. Se taparon los tubos y se agitaron vigorosamente. Se dejó reposar hasta que se formaron dos capas bien definidas, y de la superior se tomaron 20 μL para dejarlos en otro tubo. Luego se agregaron 10 μL de una solución transesterificante que contenía etóxido de potasio 0,50 M en butanol secundario, mezclándose bien y colocando los tubos en baño maría a 37°C por 10 minutos. Después de esto, a cada tubo se agregaron 50 μL de una solución oxidante que contenía ácido peryódico 4 M en ácido sulfurico 0,35 mM. Se mantuvieron los tubos en agitación por 3 minutos y se agregaron 600 μL de un reactivo de color compuesto por acetilacetona (2,4 pentanodiona) disuelto en buffer acetato de amonio 5 M y arsenito de sodio 190 mM. Se llevó al baño maría por 20 minutos a 37°C y finalmente se realizó la lectura de Absorbancia a 420 nm. El cálculo de concentración se realizó al comparar las

absorbancias de las muestras con las de un estándar de triglicéridos a una concentración de 3 g/L.

- c) **Determinación de esteroides según el método Colestat enzimático de Wiener (1990).** Se utilizó el siguiente protocolo debido a que la enzima colesterol oxidasa también reconoce fitosteroides (ver Discusión V.3 para la explicación). Se tomaron 20 µL de cada extracto clorofórmico y se les agregaron 2 mL del reactivo enzimático (colesterol oxidasa, 3 U/mL; peroxidasa, 20 U/L; lipasa fúngica 300 U/L; 4-aminofenazona 25 mM y salicilato de sodio 2,75 mM a pH 7,0). Se incubaron los tubos a 37°C por 5 minutos y se procedió a la lectura de Absorbancia a 505 nm. El valor de colesterol se cuantificó comparando las absorbancias de cada muestra con la de un estándar de colesterol 2 g/L.

3.4.7 Composición de minerales: las muestras fueron tratadas según Coombs y Hall (1985) (5 g de cada muestra bien seca colocados en una mufla a 600 °C por 3 días) para la obtención de cenizas y enviadas a la Universidad Politécnica de Barcelona para la cuantificación mediante la técnica de Plasma de Inducción Acoplado (ICP), utilizando un equipo multicanal “Termo Jarrell Ash” modelo 61E Polyscan.

3.4.8 Otras determinaciones: Los valores de pH y de Conductividad eléctrica se obtuvieron mediante un potenciómetro portátil pHmeter y un equipo portátil marca DiST WP, respectivamente.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño estadístico a utilizar fue de bloques completamente al azar con las diferentes concentraciones de sal como los tratamientos y los tiempos de extracción de muestras como bloques. Se empleó el paquete estadístico SPSS 17,0 para la comparación de medias (prueba de t-Student) y el análisis de varianza (ANOVA). La presentación de tablas de resultados y gráficos de barras se realizará mediante el programa Excel del paquete Microsoft Office 2003.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Efecto del estrés salino sobre el contenido de proteínas totales y prolina:

El estrés salino requiere que la planta ajuste una amplia gama de rasgos metabólicos y estructurales, para lo cual se requiere la actividad directa o indirecta de proteínas. Desde ese punto de vista, uno esperaría que haya una mayor síntesis de proteínas, lo que se debería traducir en un incremento en el contenido de proteínas totales.

Dombrowsky (2003) observó por ejemplo que, en plantas de tomate, el estrés salino generaba la acumulación de inhibidores de proteinasa y la activación de la expresión de otros genes relacionados a la reparación de daños. Sin embargo, no se debe dejar de pensar que también el reajuste fisiológico y estructural implicaría el bloqueo de la expresión de muchos otros genes, lo que se traduciría en una disminución del contenido de proteínas. Eso es lo que se estaría observando en la Figura 1, en la cual se muestra que a concentraciones mayores de NaCl en la solución de riego, el contenido de proteínas totales disminuye en

hojas, tallos y raíz, aunque a concentraciones bajas de sal se puede observar un incremento en tallo y raíz, lo que podría significar que habría una movilización de proteínas para mantener elevado el contenido de proteínas, sobre todo en tallo.

En el caso de hojas, se puede apreciar una disminución gradual del contenido de proteínas, lo que implicaría un control específico en la expresión genética. Similares resultados han sido descritos por Deivanai y col. (2011), quienes hallaron también una disminución del contenido de proteínas en hojas de arroz malayo por efecto de concentraciones altas de sal en el medio, quizá debido a un cambio en el metabolismo de aminoácidos y la limitación del suministro de CO₂ y la disfunción del aparato fotosintético.

Manaa y col. (2003) también encontraron que el contenido proteico disminuyó en hojas de una variedad de tomate tolerante y de otra sensible a la salinidad, independientemente del fenotipo de ambas variedades, y que la disminución era más acentuada a medida que los niveles de sal se elevaban. En el caso de la variedad sensible a sal (Super MarMande), la disminución fue más acentuada (43% a 100 mM y 55% a 200 mM) mientras que en la variedad tolerante a sal (Roma) el nivel proteico no cambió a 100 mM pero disminuyó un 25% a 200 mM.

Díaz y Salas (2007) evaluaron el contenido de proteínas totales en plantas de tomate comercial (*Lycopersicon esculentum*) y de tomate silvestre (*Lycopersicon pimpinellifolium*) mantenidas en diferentes niveles de NaCl, observando que a mayores concentraciones de sal el contenido de proteína disminuía, aunque en menor grado en *L. pimpinellifolium*. Por encima de los 100 mM, el trabajo citado describe que el contenido proteico comienza a aumentar sobre todo en raíz, lo

que podría implicar que la expresión diferencial ocurre en primer lugar en este órgano antes que en la hoja.

La prolina es un osmolito que se acumula debido al estrés salino, hídrico y de baja temperatura pero no por el estrés de alta temperatura (Hare y col., 1998). Los resultados de la Figura 2 muestran un incremento de prolina a medida que aumenta la concentración de sal en la solución de riego, llegando a un máximo a 85 mM de NaCl en tallo y hoja, mientras que en raíz el nivel máximo se alcanzó a 40 mM, lo que implicaría que la acumulación de este aminoácido se iniciaría en la raíz para controlar el desequilibrio osmótico.

Díaz y Salas (2007) mostraron acumulación de prolina tanto en el tomate comercial y en *Lycopersicon pimpinellifolium*, una especie que toleró concentraciones de hasta 205 mM de NaCl gracias a la acumulación de compuestos osmoreguladores, tales como azúcares simples, proteínas y prolina. Estos autores subrayaron el hecho de que el incremento de prolina se inicia en concentraciones bajas de NaCl, sugiriendo que eso significaría que la acumulación de este aminoácido sería uno de los primeros mecanismos que se activarían durante la adaptación a la sal en el medio. Se sabe que esta acumulación se dispara debido a la disminución de la turgencia en condiciones de estrés hídrico (Chaman y col., 2014), y esto debe estar relacionado al desequilibrio iónico, ya que se ha mostrado que en plantas superiores existe una relación inversa entre la concentración intracelular de potasio y el incremento de prolina dentro de las células (Liu y Zhu, 1997).

Definitivamente, la acumulación de prolina debe tener como principal función la regulación osmótica, aunque como se describió en el Marco Teórico, existen

referencias respecto a diversas funciones estructurales y de regulación en la cual estaría también involucrado este aminoácido. Se ha visto que el uso de rociadores permite la captación de prolina exógena, mejorando la tolerancia de embriones somáticos de apio y de cultivos celulares de tabaco, así como también se ha mostrado que el rociado foliar con este aminoácido protege a la planta de la inhibición del crecimiento causado por la sal en cultivos de nabo, arroz, trigo y maíz (Deivanai y col., 2011), mostrando así que durante el estrés salino, sobre todo por el desequilibrio hídrico, el metabolismo de la prolina es muy activo y necesario, así como su distribución por toda la planta, con una gran presencia de transportadores de este aminoácido en la superficie de las células.

4.1.2. Efecto del estrés salino sobre el contenido de carbohidratos:

La Figura 3 muestra la concentración de azúcares reductores en hojas, tallo y raíz de plantas de tomate mantenidas con soluciones hidropónicas conteniendo diferente cantidad de sal. Como la metodología que se ha utilizado en la presente tesis permite cuantificar azúcares reductores, la sacarosa no podría ser detectada ya que es un disacárido no reductor, por lo que los resultados podrían ser considerados como que hay un aumento en la movilización de monosacáridos. El tallo es considerado principalmente como una estructura vascularizada que permite el movimiento de agua, nutrientes y otros compuestos que están siendo movilizados en la planta.

Esta movilización generalmente tiene una dirección: desde los tejidos productores (en inglés “source tissues”, donde se fabrican diversos nutrientes, principalmente las hojas maduras) hacia los tejidos consumidores (en inglés “sink

tissues”, tejidos que consumen o almacenan nutrientes, como la raíz, las flores, frutos, tubérculos y yemas o brotes de ramas y hojas en crecimiento; Gupta y Kaur, 2005). En hojas, el contenido de azúcares también aumentó progresivamente, pero a 100 mM de NaCl hubo una disminución muy significativa, mientras que en tallo y raíz a esa concentración el aumento fue mucho mayor. Este comportamiento podría significar que existe una movilización de azúcares libres (reductores) desde las hojas hacia otros órganos, como la raíz en donde se acumularían, quizá para utilizarlos como reguladores osmóticos.

Un aumento similar de azúcares solubles en hojas y savia de sorgo fue descrito por Almodares y col. (2008), aunque principalmente para variedades sensibles a la salinidad. Estos mismos autores señalaron que en plantas de tomate que presentan mayor resistencia a salinidad se observa un aumento de sacarosa en hojas. Otros autores consideran resultados distintos, como Pattanagul y Thitisaksakul (2008) quienes reportaron que se puede encontrar una mayor acumulación de azúcares en respuesta a estrés salino en cultivares de arroz sensibles a la salinidad, señalando algunas referencias bibliográficas que indican que las variedades de tomate sensibles a sal también acumulan mayor cantidad de hexosas y sacarosa mientras que las variedades más tolerantes mantienen o disminuyen la concentración de estos compuestos, lo que pone en entredicho el hecho de que la variedad que se ha utilizado en el desarrollo de la presente Tesis (cv. Río Grande) pueda ser considerada como tolerante a la salinidad tal como se la describió anteriormente (Rodrigo, 1999).

Es interesante observar en la Fig. 3 que la concentración de azúcares reductores es mayor en raíz que en hojas de tomate, dato opuesto a lo descrito en otras

especies como el arroz, en donde los azúcares solubles se acumulan más en hojas que en raíz (Boriboonkaset y col., 2012).

La Figura 4 muestra el contenido de almidón en plantas de tomate mantenidas con diferentes concentraciones de sal. Se puede observar la caída significativa de almidón en hojas aún a concentraciones bajas de sal (20 mM y 40 mM), aunque se percibe una ligera recuperación a 85 mM para disminuir más a 100 mM. Si bien es cierto que estos resultados muestran cierto contenido de almidón tanto en tallo como en raíz, se tomará mayor atención a lo acontecido en hojas, ya que en las hojas se sintetiza y almacena almidón para regular la movilización de azúcares en la planta. Se observa que a medida que la planta se enfrenta a concentraciones cada vez mayores de sal, el contenido de almidón de las hojas aumenta hasta llegar a la concentración considerada como estresante (85 mM).

Este resultado está en concordancia con los de Pattanagul y Thitisaksakul (2008) quienes reportaron una acumulación de almidón en hojas maduras de cultivares de tomate tolerante a sal, quizá debido a una mayor actividad de la invertasa alcalina, que hidroliza la sacarosa y la convierte en azúcares simples, los cuales pueden servir para la síntesis del polisacárido.

4.1.3. Efecto del estrés salino sobre el contenido de clorofilas:

La Figura 5A muestra que el contenido de clorofilas en las plantas de tomate disminuye a medida que aumenta la cantidad de sal en el medio de cultivo, con una caída brusca a los 20 mM. Aunque el análisis estadístico determinó que las diferencias no eran significativas, es interesante señalar que similares resultados han sido reportados por Boriboonkaset y col. (2012), respecto a que la clorofila

a, clorofila b, clorofila total y carotenoides totales disminuyeron en variedades de arroz en estrés salino aunque la proporción clorofila a/clorofila b aumentó significativamente.

La respuesta a la salinidad con respecto a los niveles del pigmento es variable, y depende del tipo de cultivo. Por ejemplo, se ha reportado en tomate, rabanito, arroz y arveja que el contenido de clorofila disminuye a medida que aumenta la concentración de sal en el medio, pero aumenta en mijo perla, mostaza, remolacha azucarera y repollo (Jamil y Rha, 2013).

Por otro lado, las diferencias no significativas podrían explicarse al hecho que la variedad “Río Grande” del tomate, utilizado en el presente trabajo, es medianamente tolerante a la salinidad (Rodrigo, 1999). Se sabe que ciertos rasgos como la acumulación de prolina, una alta relación K^+/Na^+ , una baja acumulación de sodio y cloro y el mantenimiento de los niveles de clorofila, son rasgos que se pueden encontrar en genotipos de plantas más tolerantes a la sal (Akça y Samsunlu, 2012).

En la presente Tesis, también se observó que la proporción clorofila a/clorofila b tiene una tendencia a aumentar a los 20 mM, luego desciende a los 40 mM para tratar de recuperarse a partir de los 85 mM de sal en el medio. Estos cambios pueden estar relacionados a los procesos de adaptación a la salinidad del medio. En variedades de nogal tolerantes a la sal, se ha encontrado mayor contenido de clorofila b que en las variedades menos tolerantes (Akça y Samsunlu, 2012).

La explicación de la disminución de clorofilas en plantas en estrés salino puede ser variada. Principalmente se cree que podría deberse a una reducción en el

área foliar, estrategia para reducir la transpiración y también para reducir la acumulación de sodio en hojas (Amirjani, 2010), lo que evidentemente reduce el crecimiento y productividad de la planta, como por ejemplo se ha observado en sorgo (Almodares y col, 2008). La reducción en el área foliar también ha sido observada en la variedad “Río Grande”, tanto por Rodrigo y Salas (2001) y en el presente trabajo (Figura 16). Se ha observado que como respuesta al estrés salino, la planta acorta su ciclo de crecimiento, generando una rápida maduración de las hojas (Akça y Samsunlu, 2012) y a la vez disminuyendo su capacidad de emisión de brotes. Esto gatillaría el mecanismo de senescencia y necrosis foliar, alterando el proceso fotosintético (De Lucena y col., 2012). Otro fenómeno que podría generar la disminución de clorofila podría ser el cierre estomático (Almodares y col, 2008) o el aumento de la actividad clorofilasa, enzima que degrada clorofila, o la degradación de β -caroteno y la formación de zeaxantinas, que aparentemente están envueltas en la protección contra la fotoinhibición (Lu y col., 2010).

La acumulación de iones durante el estrés salino sería el factor que afecta adversamente la concentración de clorofila. Por ejemplo, el contenido de clorofila del arroz mantenido en estrés salino puede ser descrito como una función del contenido de sodio de las hojas, ya que se ha mostrado que la acumulación de cloruro de sodio en las hojas reduce la fotosíntesis neta y el crecimiento de la planta (Amirjani, 2010). Esto puede deberse a que la sal debilita el complejo proteína-pigmento-lípido en la estructura del cloroplasto, y al aumento de la actividad clorofilasa (Ali y col., 2004; Taffouo y col., 2010).

Los iones acumulados en plantas en estrés salino inhiben la síntesis de diferentes fracciones de clorofila, disminuyendo el contenido de ácido amino-

levulínico (ALA) a nivel de la ALA deshidrogenasa (Ali y col., 2004; Santos, 2004). Parece que también existe una relación entre el estrés oxidativo causado por la salinidad y el contenido de clorofila. En arvejas verdes, se ha observado la disminución de clorofila probablemente debido a que existe una baja actividad de enzimas antioxidantes como APX (ascorbato peroxidasa), CAT (catalasa) y GR (glutación reductasa), mientras que no se han visto cambios en estos parámetros en genotipos tolerantes a la sal (Yasar y col., 2008).

4.1.4. Efecto del estrés salino sobre el contenido de lípidos en plantas:

Los lípidos son constituyentes esenciales de las plantas. Las células vegetativas contienen aproximadamente 5 – 10 % de lípidos por peso seco, principalmente formando parte estructural de las membranas celulares (Ohlrogge y Browse, 1995). La función de los lípidos de la membrana celular en la tolerancia a la salinidad puede deberse a que son los más grandes mediadores de la fluidez de membrana o son componentes importantes en los mecanismos de transducción de señal, tráfico vesicular y reorganización del citoesqueleto (como por ejemplo el ácido fosfatídico, ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, Zamani y col., 2010).

La Figura 6 muestra el contenido de lípidos totales en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad, observándose que el contenido de lípidos aumenta en tallo y hoja mientras que decrece en raíz a medida que el contenido de NaCl aumenta en la solución de riego. El resultado en raíces está de acuerdo a lo que se considera que ocurre durante el estrés hídrico, respecto a una disminución en el contenido de lípidos en la membrana

celular, en correlación con una inhibición de la biosíntesis de lípidos y una estimulación de actividades lipolíticas y peroxidativas (Gigon y col., 2004). El componente hídrico en el estrés salino en algunos casos afecta a toda la planta: en almácigos de maíz, el contenido total de lípidos polares y de fósforo en lípidos disminuyó en respuesta a la sequía (Shannon, 1992).

Si el contenido de lípidos en la raíz disminuye con los niveles de salinidad en el medio, esto principalmente debe estar afectando la estructura de la membrana. En raíces de *Plantago media*, el contenido de fosfo-, galacto- y sulfolípidos disminuyó significativamente a medida que se elevó la concentración de NaCl en el medio de riego, lo que habría generado una disminución en la permeabilidad de la membrana (Shannon, 1992). En cambio, el aumento de lípidos en hojas estaría relacionada con una disminución de la fluidez de sus membranas, lo que estaría relacionado con una disminución de la permeabilidad a la sal, ya que una bicapa lipídica menos fluida en la membrana soporta una permeabilidad reducida al NaCl (Wu y col., 2005).

El análisis de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé (Tabla XI) permite observar que la raíz presenta diferencias significativas en su contenido lipídico aún a concentraciones bajas de sal (20 mM), mientras que, en tallo y hojas, las diferencias son significativas recién a partir de la presencia de 85 mM de NaCl en la solución de riego, lo cual podría sugerir que la raíz es la primera estructura en verse afectada por el estrés salino, por lo que inmediatamente empieza a generar ajustes metabólicos tempranos, aún a niveles bajos de salinidad. En cambio, en hojas, deben existir otros mecanismos de respuesta a la salinidad que permitirían el mantenimiento del metabolismo tisular hasta que

la concentración de sal llega a un nivel estresante (en este caso, 85 mM), en donde recién se podrían apreciar los ajustes metabólicos.

Gigon y col. (2004) observaron en hojas de *Arabidopsis thaliana* que el contenido de lípidos disminuía a los 15 días de cultivo, incluso en las plantas control, con una recuperación significativa a las 24 horas de rehidratación, aunque el tipo de lípidos y su contenido de ácidos grasos no fueron significativamente afectados hasta que el estrés inducido se volvió muy severo. La acumulación de lípidos también ocurre en algas en respuesta al estrés ambiental, incluyendo deficiencias de nutrientes (Asulabh y col., 2012).

La Figura 7 muestra el contenido de triglicéridos, observándose una tendencia muy similar a la de los lípidos totales. Los triglicéridos no son componentes de las membranas celulares, son producidos finalmente en el citoplasma y se almacenan como gotas lipídicas o también llamadas gotas de grasa. Se ha estudiado mucho la presencia y composición de triglicéridos en semillas (Chapman y col., 2012; Ohlrogge y Browse, 1995; Schmid y Ohlrogge, 2002; Yu y col., 2011), mientras que se sabe que también hay síntesis en hojas, flores y frutos, aunque se conoce poco acerca de la formación y función de las gotas de lípidos en estos tejidos (Chapman y col., 2012). El análisis de comparaciones múltiples (Tabla XIII) también indica diferencias significativas en hojas a partir de los 40 mM de NaCl, mientras que en raíz las diferencias son significativas si se compara el medio Control (0 mM) y el de 20 mM de NaCl con los otros tratamientos, lo cual permite reforzar la conclusión de que la raíz es la primera estructura que genera sus ajustes metabólicos al percibir niveles relativamente bajos de sal.

En animales, los triglicéridos tienen como función básica el almacenamiento de energía, mientras que en plantas, se considera que pueden tener doble función: por un lado se les considera como una fuente efectiva de energía sobre todo para la germinación de la semilla (Yu y col., 2011) y, por otro lado, son considerados como la principal forma de almacenamiento de carbono en las semillas (Ohlrogge y Browse, 1995) aunque, sobre la base de la planta entera, se almacena carbono más como carbohidratos que como lípidos (Schmid y Ohlrogge, 2002).

El hecho de que los resultados de la presente Tesis muestren que se acumula más triglicéridos en las hojas en estrés salino, podría implicar que en este tipo de tejido las células entran en mayor actividad metabólica utilizando los triglicéridos sea como fuente de energía o como fuente de carbonos para la síntesis de carbohidratos osmoreguladores. Por otro lado, los triglicéridos se almacenan dentro de las llamadas gotas de lípidos, en cuya superficie existen proteínas asociadas, una de las cuales (las caleosinas) cumplen con algunos roles durante el estrés ambiental, tales como su actividad lipoperoxigenasa, produciendo epóxidos en los ácidos grasos insaturados, lo que se ha visto que ocurre en respuesta a estrés, como el hídrico, el salino y el osmótico (Chapman y col., 2012).

El colesterol es abundante en tejidos animales, pero en plantas se encuentra en cantidades prácticamente despreciables (Schmid y Ohlrogge, 2002; López-Pérez y col, 2009)), pero en contraste están los esteroides (también generados a partir del escualeno) dentro de los cuales los más abundantes son el estigmasterol y el sitosterol, que presentan mucha analogía estructural con el colesterol. La determinación enzimática empleada en la presente Tesis utiliza la

colecsterol oxidasa, una enzima que no sólo actúa sobre el colecsterol, sino que su acción es sobre esteroides debido a su acción específica sobre el hidroxilo 3- β (Lange, 1992) y la presencia de un doble enlace en las posiciones Δ -4 o Δ -5 (Richmond, 1973). Tampoco se considera que la extracción Soxhlet pueda haber interferido con la reacción enzimática, ya que se conoce que la enzima utilizada en este tipo de determinaciones es de origen microbiano y su actividad aún es estable en presencia de solventes orgánicos y de detergentes (Kumari y Kanwar, 2012).

Por lo dicho, la Figura 8 muestra entonces la variación de esteroides en relación a la concentración de sal en el medio de cultivo. Se observa una brusca disminución en raíz en presencia de 20 mM de NaCl, mientras que en hojas, existe una elevación hasta los 40 mM y a mayor salinidad, la concentración tiende a mantenerse elevada. La Tabla VI muestra los resultados de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé, en la cual se observan diferencias significativas en hojas al comparar cultivos sin estrés salino (0 mM de NaCl) con cualquiera de los cultivos mantenidos a diferentes condiciones de salinidad, lo que puede implicar una respuesta inmediata a cualquier concentración de sal en el medio de cultivo. En el caso de raíces, el análisis muestra diferencias significativas en cultivos sin estrés salino y cultivos tratados con 20 mM de NaCl, lo que confirma que los niveles de esteroides disminuyen bruscamente a partir de esta concentración salina en el medio de cultivo.

Al igual que el colecsterol en animales, la principal función de los esteroides en plantas es formar parte estructural de las membranas y determinar su viscosidad y estabilidad (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Los esteroides libres son importantes en la adaptación al estrés salino, ya que pueden regular la actividad de enzimas

de membrana, la permeabilidad y fluidez de la membrana y la absorción de iones a nivel de membrana (Zamani y col., 2010). Por tanto, se podría considerar que en el caso de la presente Tesis, la respuesta al estrés salino es disminuir los niveles de esteroides en las células de raíz para aumentar su fluidez y permeabilidad, mientras que en las células de hoja se eleva la concentración de esteroides, haciendo las membranas celulares menos fluidas y permeables.

Este tipo de respuesta no es constante en todas las especies de plantas. Zamani y col. (2010) observaron que la salinidad afectaba de manera diferente los niveles de esteroides totales en diferentes cultivares de canola (*Brassica napus*) ya que en algunos cultivares disminuía su concentración, mientras que en otros se elevó. En cambio, Wu y col. (2005) observaron en cultivos de callos de *Spartina patens* un incremento de lípidos en respuesta a elevados niveles de NaCl, y que la fracción más importante acumulada fue la de esteroides, entre los cuales disminuyó el sitosterol y se elevó el campesterol. En otros tipos de estrés, como la adaptación al frío y la patogénesis también se alteran drásticamente el contenido de esteroides libres y derivados (Schmid y Ohlrogge, 2002).

4.1.5. Efecto del estrés salino sobre el metabolismo de minerales:

La Figura 9A muestra que la acumulación de sodio es directamente proporcional a la concentración de NaCl en la solución de riego, sobre todo en hoja y también en tallo. En cambio, el contenido de sodio en raíz recién se eleva significativamente a los 100 mM de sal. Estos datos implicarían que inicialmente la raíz absorbe este elemento y lo envía a la parte aérea de la planta,

principalmente a las hojas donde comienza su almacenamiento. La Figura 9B muestra que el contenido de potasio sigue un comportamiento inverso al del sodio en las estructuras de la planta. La literatura indica que en plantas no halófitas, las elevadas concentraciones de sodio disminuyen la captación de potasio (Casierra y col., 2000) debido a la competencia directa entre estos dos elementos a nivel de la membrana plasmática (sobre todo para su absorción), la inhibición del sodio sobre el transporte de potasio en los tejidos del xilema y/o el eflujo de K^+ inducido por Na^+ en las raíces (Amirjani, 2010). La Figura 9C muestra que a medida que aumenta la concentración de NaCl en la solución de riego también aumenta los niveles de calcio. En el caso de las hojas, este incremento de calcio es marcado a partir de los 20 mM de NaCl en el medio, mientras que en raíz es a partir de los 40 mM. Este incremento podría estar relacionado con su función mediadora en las vías de señalización de mensajes intracelulares que activan la expresión genética asociada a la respuesta al estrés salino y, además, a la función de este elemento en cuanto a la atenuación de la pérdida de potasio y la inhibición de mayor captación de sodio (Chávez y González, 2009). Respecto al magnesio, la Figura 9D muestra un comportamiento similar de la elevación de este elemento en hojas y raíces, aun cuando el incremento se acentúa en raíces a partir de los 85 mM de NaCl en el medio. Esto podría estar relacionado con las funciones metabólicas que cumple este elemento, como cofactor de enzimas, sobre todo del metabolismo energético (Heyer, 2000) que tendría que ver con la movilización y almacenamiento de azúcares simples como osmolitos y la activación de las bombas de transporte activo de iones a nivel de la membrana.

Los resultados de la presente Tesis muestran en prácticamente todos los parámetros estudiados un cambio significativo a partir de los 85 mM de NaCl en la solución de riego. Similares resultados han sido mostrados por Salas y col (1999) y Díaz y Salas (2007) quienes consideraron que a esta concentración de sal en el medio, las plantas de tomate se encuentran en un estrés salino definido. Considerando lo mencionado, se utilizó esta concentración de sal en la solución de riego para mantener en estrés salino cultivos de tomate hasta los 130 días para analizar su contenido de minerales.

En la Figura 10 se muestra el contenido de minerales en hojas superiores, medias e inferiores de los cultivos, observándose que el calcio se mantiene elevado en hojas inferiores más que en superiores en plantas normales, mientras que en plantas en estrés salino ocurre el caso inverso (Fig. 10A y B). Lo resaltante es el contenido de sodio, ya que se puede observar que el incremento de este elemento es mayor en hojas superiores más que en inferiores, tanto en medio Normal como en el Salino (Fig. 10C y D). Esto parece contradecir lo afirmado por la literatura, que considera que en glicofitas, la principal respuesta al estrés salino en hojas sería la exclusión o la exportación de sales al exterior (Ullah y col., 1994), sobre todo en hojas jóvenes a fin de no perturbar la capacidad fotosintética (García y Medina, 2009). Se esperaba que esta exclusión permitiera la movilización de iones tóxicos como el sodio hacia las hojas inferiores, adultas, entrando ya en senescencia, como una forma de eliminar el exceso de sodio.

Los resultados muestran que esta movilización no es marcada en los cultivos hidropónicos de tomate, por lo que el mecanismo de respuesta al estrés estaría relacionado con la acumulación del sodio dentro de las células de las hojas, quizá

principalmente dentro de la vacuola, gracias a mecanismos de transporte activo (Casierra y col., 2000). Respecto al potasio (Fig. 10E y F), se observa la disminución tanto en plantas en medio normal como en las mantenidas en medio salino como un reflejo de la acumulación de sodio. En el caso del magnesio (Fig. 10G y H), se observa que en plantas mantenidas en medio normal, hay un aumento de este elemento en hojas superiores y medias, mientras que en medio salino, las plantas de tomate muestran una reducción marcada de magnesio en hojas inferiores, lo que podría estar relacionado con la disminución en la síntesis de colorofilas a diferentes niveles de sal, mostrada en la Figura 5.

La Figura 11 muestra el contenido de minerales en tallo y raíz de estos cultivos de tomate. Se puede observar que el calcio aumenta gradualmente en tallo hasta el día 105 de cultivo (Fig. 11A), tanto en medio normal como en salino, mientras que en raíz de plantas en estrés aumentó de la misma forma, a diferencia de las raíces de plantas normales. La fig. 11B muestra que los niveles de sodio no aumentan significativamente en raíces en ambas condiciones, resultado similar con respecto al contenido de potasio (Fig. 11C) y al de magnesio (Fig. 11D).

La figura 12 muestra los resultados de un experimento en las cuales plantas de tomate mantenidas en estrés salino a partir de los 48 días de cultivo y luego pasadas a condiciones normales a partir de los 61 días, con el fin de analizar la capacidad de recuperación de las plantas en cuanto a su contenido de minerales en tallo y hojas luego de quitarles las condiciones estresantes. Se puede observar que el contenido de calcio en hojas salinas es casi el mismo que en hojas normales, mientras que el contenido de sodio disminuye significativamente a partir del día de cambio de las plantas estresadas al medio normal. El

contenido de potasio de las hojas salinas también tienden a alcanzar los niveles de este elemento en hojas normales. Respecto al magnesio se observa que hasta los 66 días, el contenido de este elemento en hojas salinas sigue disminuido respecto al de hojas normales, lo que implicaría que la recuperación del contenido de magnesio en plantas en estrés salino no ocurre a través de mecanismos similares a los que regulan el contenido de los otros elementos, sino que requiere de procesos a largo plazo.

Finalmente, se procedió a medir el contenido de azúcares, pH, conductividad eléctrica y minerales en frutos de tomate mantenidos en estrés salino comparados con los normales. La Tabla XVI muestra que el contenido de azúcares es mayor a medida que aumenta el tiempo de cosecha, y sobre todo son significativamente mayores en plantas en estrés salino que en plantas normales. Esto puede deberse quizá a un fenómeno de adaptación a la edad de la planta (senescencia; Lu y col., 2010), por lo que cuanto mayor sea el tiempo de cosecha, mayor acumulación de azúcares. Lu y col. (2010), también observaron que el estrés salino aumenta el contenido de azúcares solubles y la proporción azúcar:ácido en frutos maduros de tomate, considerando que este cambio metabólico ocurriría durante el estadio temprano de su desarrollo.

La Tabla XVII muestra los valores de Conductividad eléctrica, observándose también valores mayores en frutos de plantas en estrés salino que en las normales. Respecto al pH (Tabla XVIII) se observa que en la primera cosecha, los frutos en estrés salino presentaban un valor menor que los frutos normales, pero en los otros tiempos de cosecha fueron mayores. Katsuhara y col. (1999) mostraron que el estrés salino generó una acidificación intracelular en células del ápice radicular de cebada, mientras que ocurría una alcalinización

extracelular, considerándose que esto sería un reflejo de los ajustes de la actividad de bombas protónicas a nivel de membrana celular como a nivel de la vacuola. En el tomate, la acumulación de azúcares reductores podría sugerir que también se estarían acumulando otros compuestos, como ácidos orgánicos (quizá ácido ascórbico, entre otros).

La Tabla XIX muestra el contenido de minerales de frutos en dos tiempos de cosecha, observándose que principalmente el sodio es el elemento que aumenta significativamente en los frutos en estrés salino. El aumento de azúcares y un posible aumento de ácidos orgánicos (sobre todo en la primera cosecha) en respuesta al incremento de sodio en el fruto salino, causaría un cambio en las características organolépticas del fruto, sobre todo el sabor, como ya fue descrito por Rodrigo (1999), quien observó que los frutos salinos de tomate presentaban un sabor marcado mostrado por una mayor preferencia de consumo en una encuesta de degustación.

Los resultados de la presente tesis muestran que las plantas de tomate controlan de una manera dinámica el metabolismo celular en respuesta a la salinidad del medio y al cambio en los niveles de captación y almacenamiento de minerales en hojas y raíz.

4.2. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.2.1. Efecto del estrés salino sobre el contenido de proteína y prolina:

La Figura 1 muestra el contenido de proteínas totales (en $\mu\text{g/g}$ de peso seco) en muestras de hojas, tallo y raíz de plantas de tomate regadas con diferentes

condiciones de salinidad por 30 días (Experimento 1). Se puede observar que en tallo y raíz se incrementan los niveles de proteínas a medida que aumenta la salinidad en el medio hasta 40 mM de NaCl, pero luego desciende en concentraciones mayores de sal. En el caso de las hojas, el contenido de proteínas totales disminuye también marcadamente a partir de los 40 mM de sal.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en hoja y raíz, mientras que en tallo los valores no mostraron diferencias significativas (Tabla I). El análisis de comparaciones múltiples muestra también que las diferencias significativas fueron halladas en hoja y raíz, sobre todo cuando las comparaciones se realizaban con las plantas que se mantuvieron con concentraciones altas de sal (85 mM y 100 mM).

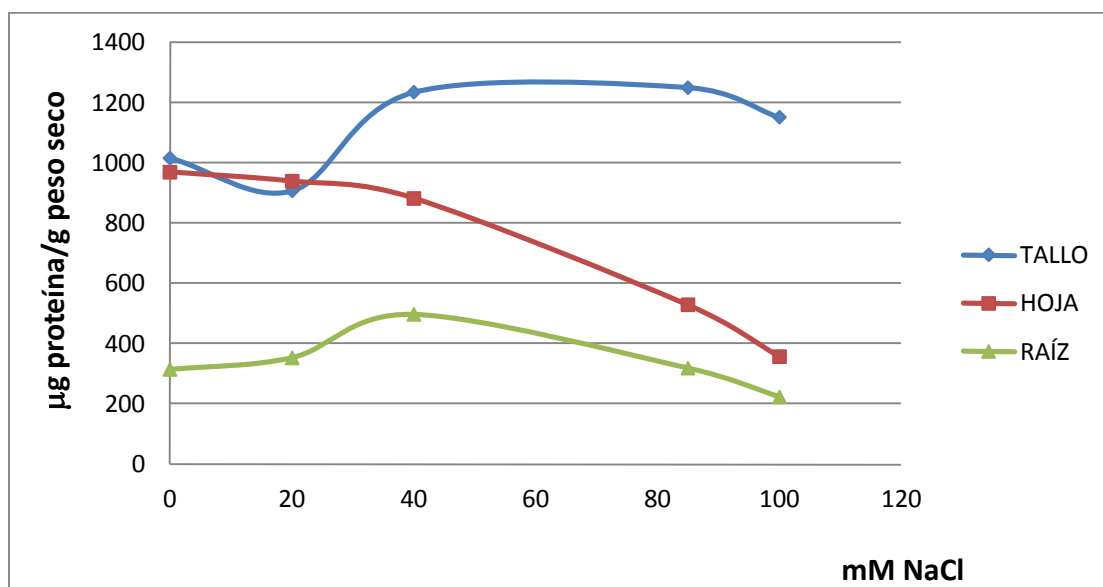


Figura 1. Contenido de proteínas totales en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.

Tabla I. Análisis estadístico de los valores de proteínas totales (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

mM	RAÍZ*			TALLO**			HOJA***		
NaCl	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)
0	313.20	35.29	11.27	1015.88	112.74	11.10	968.93	199.31	20,57
20	352.16	57.88	16.44	906.23	142.59	15.73	938.41	110,40	11.76
40	495.87	36.94	7.45	1233.73	14,06	1.14	881.97	118.40	13.42
85	318.13	40,84	12.84	1249.78	190,47	15.24	527.44	127.47	24.17
100	223.17	14.78	6.62	1150,70	306.88	26.67	356.48	21.39	6,00

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,172

***p valor por prueba Anova = 0,000

La Figura 2 muestra el incremento de prolina (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en las tres estructuras de las plantas de tomate del Experimento 1 a medida que aumenta la concentración de sal en la solución de riego. Este incremento es progresivo, alcanzando un máximo a los 85 mM de NaCl para luego disminuir a 100 mM de sal. Se puede observar que los niveles más altos de prolina se encontraron en tallo, mientras que la elevación ocurrió primero en raíz que en tallo y hoja.

Tabla II. Análisis de comparaciones múltiples de los valores de proteínas totales de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM – 20 mM	0,964	0,999	0,830
0 mM – 40 mM	0,708	0,948	0,004*
0 mM – 85 mM	0,654	0,026*	1,000
0 mM – 100 mM	0,928	0,003*	0,181
20 mM – 40 mM	0,359	0,989	0,019*
20 mM – 85 mM	0,317	0,039*	0,886

20 mM – 100 mM	0,619	0,004*	0,035*
40 mM – 85 mM	1,000	0,082	0,005*
40 mM – 100 mM	0,987	0,009*	0,000*
85 mM – 100 mM	0,975	0,632	0,148

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($p < 0,05$)

Los valores de prolina obtenidos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) tanto en tallo como en hoja y raíz (Tabla III), mientras que el análisis de Scheffé mostró que las diferencias son significativas principalmente para la raíz a cualquier nivel de salinidad (Tabla IV).

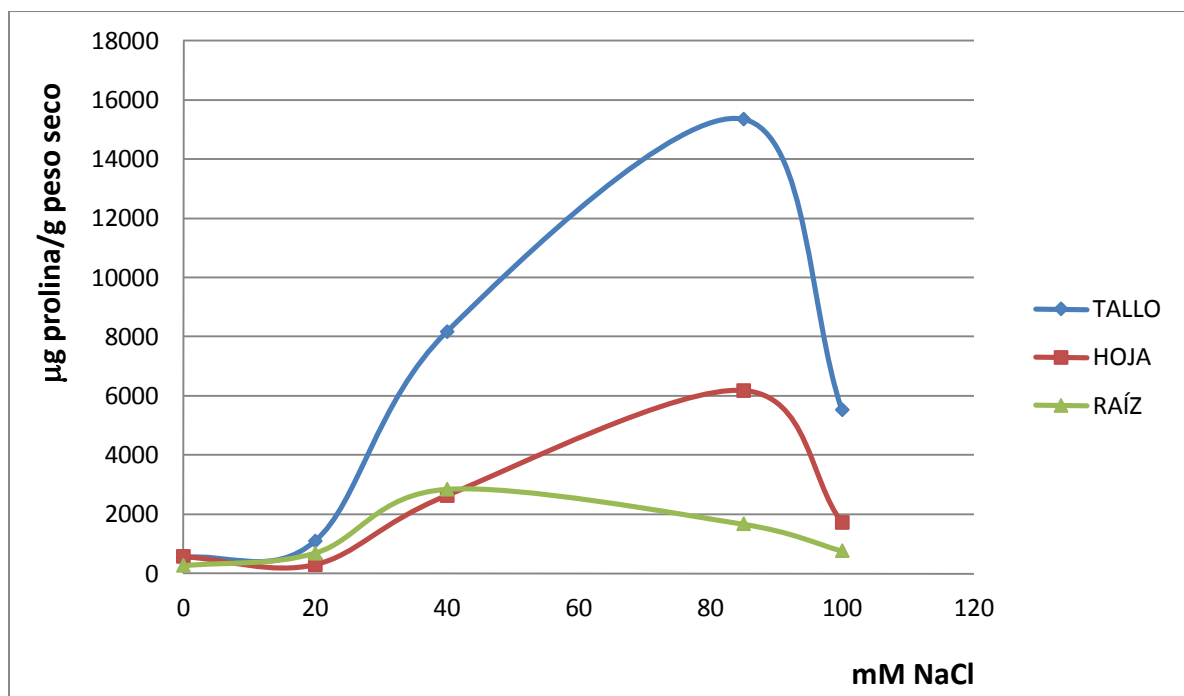


Figura 2. Concentración de prolina en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.

Tabla III. Análisis estadístico del contenido de prolina (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.

mM	RAÍZ*			TALLO**			HOJA***		
NaCl	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)
0	249.90	28.19	11.28	515.38	81.88	15.89	559.63	97.58	17.44
20	678.14	110.94	16.36	1081.55	41.76	3.86	287.94	31.93	11.09
40	2833.79	362.62	12.80	8157.33	912.60	11.19	2626.10	108.67	4.14
85	1654.80	194.68	11.76	15345.10	3964.28	25.83	6177.45	781.41	12.65
100	749.04	65.23	8.71	5526.11	842.20	15.24	1717.31	463.67	27.00

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,000

***p valor por prueba Anova = 0,000

Tabla IV. Análisis de comparaciones múltiples de los valores de prolina de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM – 20 mM	0,997	0,952	0,198
0 mM – 40 mM	0,008*	0,002*	0,000*
0 mM – 85 mM	0,000*	0,000*	0,000*
0 mM – 100 mM	0,090	0,074	0,109
20 mM – 40 mM	0,014*	0,001*	0,000*
20 mM – 85 mM	0,000*	0,000*	0,002*
20 mM – 100 mM	0,149	0,024*	0,994
40 mM – 85 mM	0,012*	0,000*	0,000*
40 mM – 100 mM	0,579	0,200	0,000*
85 mM – 100 mM	0,001*	0,000*	0,003*

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($p < 0,05$)

4.2.2. Efecto del estrés salino sobre el contenido de azúcares reductores y clorofila:

Los resultados presentados en la Figura 3 muestran la cantidad de azúcares reductores (en mg/g peso seco) en cultivos de 30 días de tomate según la concentración de sal presente en la solución hidropónica (Experimento 1). Como se puede observar, en tallo y raíz el comportamiento es prácticamente similar, con una ligera tendencia a aumentar junto con la concentración de sal en la solución de riego, pero este incremento es brusco en tallo y raíz de plantas que estuvieron expuestas a 100 mM de NaCl. El contenido de azúcares reductores en hojas fue también aumentando, siendo completamente notorio a 20 mM de NaCl, llegando al máximo incremento a los 85 mM de sal, para descender significativamente a los 100 mM de NaCl.

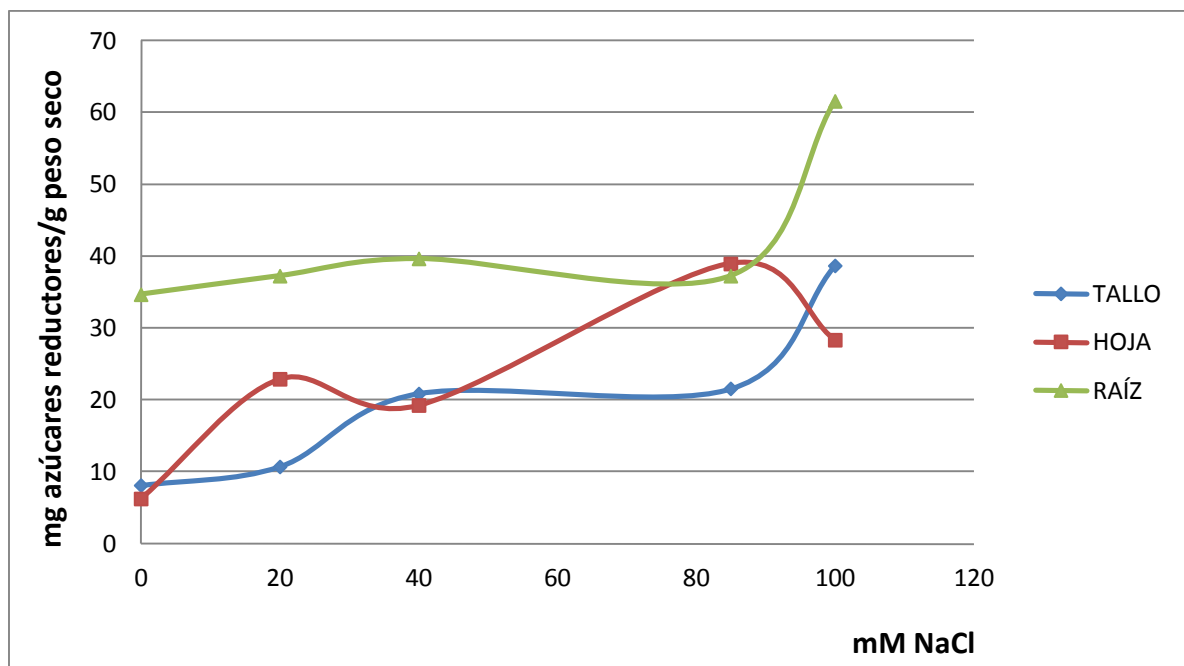


Figura 3. Contenido de azúcares reductores en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de azúcares en las tres estructuras de las plantas evaluadas (Tabla V). La Tabla VI muestra diferencias significativas de los valores de azúcares en tallo, raíz y hojas cuando se comparan los diversos tratamientos.

Tabla V. Análisis estadístico del contenido de azúcares reductores (en mg/g peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.

mM NaCl	RAÍZ*			TALLO**			HOJA***		
	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)
0	34.68	1.85	5.35	8,04	0,92	11.38	6.24	0,82	13.18
20	37.25	3.75	10,06	10,66	0,99	9.28	22.84	2,09	9.13
40	39.62	2.31	5.84	20,83	3.93	18.86	19.18	3.28	17,09
85	37.24	5.81	15.61	21.49	1.49	6.95	38.94	4.26	10,94
100	61.57	4,00	6.49	38.61	3.85	9.96	28.30	2.62	9.25

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,000

***p valor por prueba Anova = 0,000

Tabla VI. Análisis de comparaciones múltiples de los valores de azúcares reductores de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM – 20 mM	0,822	0,001*	0,949
0 mM – 40 mM	0,002*	0,004*	0,652
0 mM – 85 mM	0,002*	0,000*	0,949
0 mM – 100 mM	0,000*	0,000*	0,000*
20 mM – 40 mM	0,012*	0,661	0,961
20 mM – 85 mM	0,080	0,001*	1,000

20 mM – 100 mM	0,000*	0,312	0,000*
40 mM – 85 mM	0,999	0,000*	0,960
40 mM – 100 mM	0,000*	0,039*	0,001*
85 mM – 100 mM	0,000*	0,016*	0,000*

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($p < 0,05$)

La Figura 4 muestra que el contenido de almidón (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) disminuye a partir de los 20 mM de NaCl en la solución hidropónica, siendo más notorio en hojas que en tallo y raíz. Es interesante observar que en hojas, el contenido de almidón va aumentando progresivamente luego de los 20 mM de sal en proporción a la concentración de NaCl en la solución hidropónica hasta los 85 mM, disminuyendo bruscamente a los 100 mM de sal.

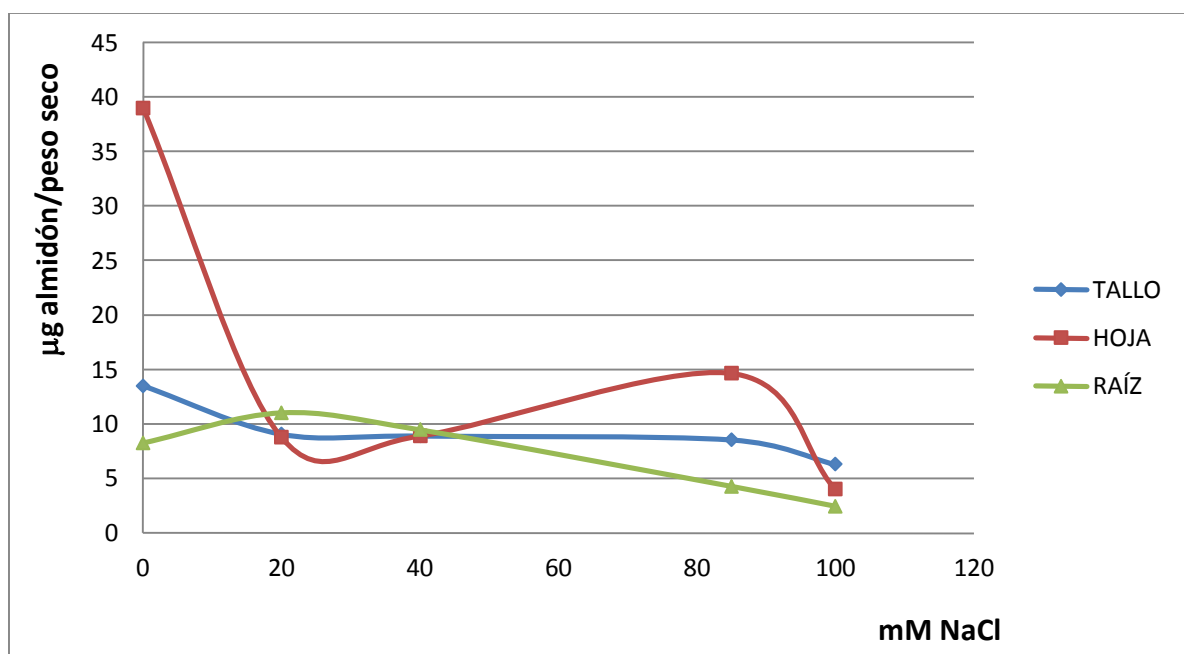


Figura 4. Contenido de almidón (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.

La Tabla VII muestra que las diferencias encontradas entre los niveles de almidón fueron significativas ($p < 0,05$) para tallo y hoja, señal de la importancia de ambas estructuras de la planta para el metabolismo de este polisacárido. Esta conclusión queda confirmada cuando se observan las comparaciones múltiples entre los tratamientos (Tabla VIII).

Tabla VII. Análisis estadístico del contenido de almidón (en $\mu\text{g/g}$ peso seco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes grados de salinidad.

mM	RAÍZ*			TALLO**			HOJA***		
NaCl	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)	PROMEDIO	D.S.	CV (%)
0	8.22	0	0	13.46	1.59	11.83	38.99	2.23	5.73
20	10,99	0,72	6.59	9,04	0,97	10,72	8.74	0,70	8,00
40	9.43	1.10	11.68	8.88	1.43	16.14	8.88	1.50	16.93
85	4.23	0,37	8.71	8.52	0,59	6.98	14.63	3.36	22.95
100	2.40	0,16	6.54	6.27	1,06	16.90	3.96	0,24	6,07

*p valor por prueba Anova = 0,473

**p valor por prueba Anova = 0,000

***p valor por prueba Anova = 0,000

Tabla VIII. Análisis de comparaciones múltiples de los valores de almidón de plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM – 20 mM	0,016*	0,000*	1,000
0 mM – 40 mM	0,012*	0,000*	1,000
0 mM – 85 mM	0,008*	0,000*	0,677
0 mM – 100 mM	0,000*	0,000*	1,000

20 mM – 40 mM	1,000	1,000	1,000
20 mM – 85 mM	0,989	0,053	0,691
20 mM – 100 mM	0,162	0,137	1,000
40 mM – 85 mM	0,997	0,060	0,683
40 mM – 100 mM	0,202	0,121	1,000
85 mM – 100 mM	0,315	0,001*	0,647

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($p < 0,05$)

La Figura 5A muestra el contenido de clorofilas (en mg/g peso fresco) en plantas de tomate con diferentes concentraciones de sal, observándose que el contenido total de clorofilas tiene un comportamiento similar que el de la clorofila a, con una disminución en medios salinos con respecto al contenido obtenido en tomates mantenidos con Solución Normal, con un pequeño incremento a los 85 mM. Puede observarse que los valores de clorofila a y b siguen un comportamiento inverso a partir de los 40 mM de NaCl; es decir, si el valor de clorofila a disminuye, el de clorofila b aumenta. Sin embargo, el análisis estadístico muestra diferencias no significativas entre estos valores ($p > 0,05$, Tabla IX). Al analizar el cociente entre los dos tipos de clorofila (Fig. 5B), se observa un descenso a los 40 mM de NaCl y luego una recuperación a niveles mayores de salinidad en la solución hidropónica.

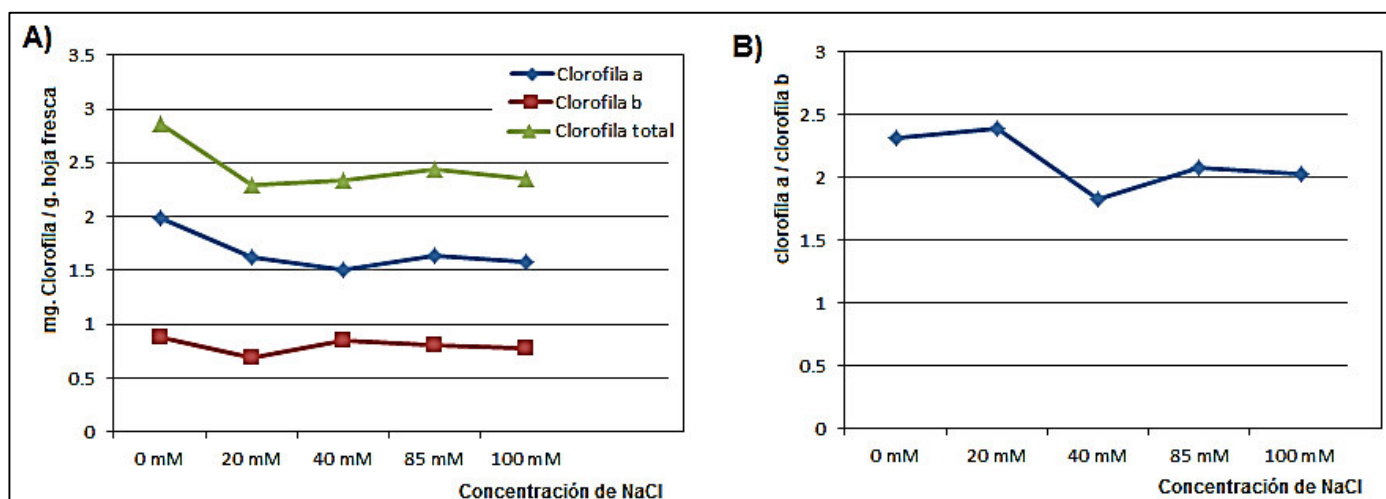


Figura 5. Contenido de clorofilas (en mg/g peso fresco) y cociente clorofila a/clorofila b en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes concentraciones de NaCl.

Tabla IX. Análisis estadístico de la concentración de clorofilas (en mg/g peso fresco) en plantas de tomate mantenidas por 30 días a diferentes niveles de salinidad.

Niveles de NaCl	Clorofila a*			Clorofila b*		
	Promedio	D.S.	C.V. (%)	Promedio	D.S.	C.V. (%)
0 mM	1.98	0,47	23.85	0,88	0,11	12.22
20 mM	1.62	0,05	2.94	0,68	0,07	10,84
40 mM	1.50	0,22	14.35	0,84	0,13	15.10
85 mM	1.64	0,17	10,50	0,81	0,12	14.90
100 mM	1.57	0,14	8.80	0,78	0,06	7.19

*p valor por prueba Anova = 0,247

**p valor por prueba Anova = 0,228

4.2.3 Efecto del estrés salino sobre el contenido de lípidos en plantas.

a) Lípidos Totales: La Figura 6 muestra los contenidos de lípidos totales (en mg/mL de extracto lipídico) en plantas de tomate mantenidas por 30 días con diferentes condiciones de salinidad (Experimento 1). Se puede observar que el contenido lipídico total en tallos y hojas aumenta de manera directa con la concentración de NaCl en la solución de riego, con un incremento marcado en hojas a una concentración de 100 mM de NaCl. En la raíz, en cambio, se puede observar que el contenido de lípidos totales disminuye a medida que aumenta la concentración de sal en la solución de riego. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, Tabla X).

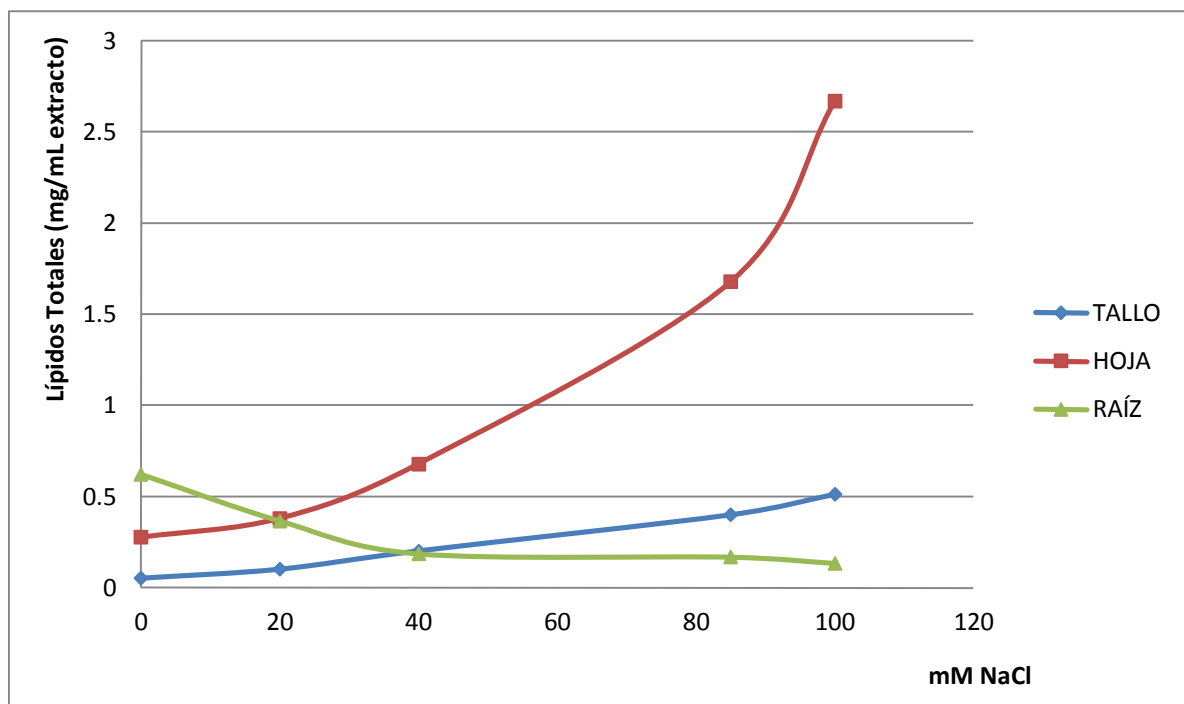


Figura 6. Contenido de lípidos totales en plantas de tomate mantenidas en diferentes condiciones de Salinidad.

Tabla X. Análisis estadístico del contenido de lípidos totales (en mg/mL de extracto lipídico) en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

[NaCl]	TALLO*		HOJA**		RAÍZ***	
	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)
0 mM	0.052 ± 0.002	3.399	0.276 ± 0.041	14.976	0.621 ± 0.129	20.756
20 mM	0.101 ± 0.006	5.513	0.380 ± 0.035	9.147	0.366 ± 0.042	11.548
40 mM	0.201 ± 0.054	26.827	0.680 ± 0.077	11.335	0.185 ± 0.036	19.664
85 mM	0.399 ± 0.068	16.941	1.678 ± 0.090	5.357	0.167 ± 0.005	2.936
100 mM	0.511 ± 0.083	16.219	2.669 ± 0.436	16.352	0.133 ± 0.010	7.368

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,000

***p valor por prueba Anova = 0,000

El análisis de comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé permite apreciar diferencias significativas entre los grupos Control y de diferentes condiciones de salinidad (Tabla XI), sobre todo a partir de las comparaciones con el tratamiento de 85 mM de NaCl.

Tabla XI. Comparaciones múltiples del contenido de lípidos totales en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM - 20 mM	0,860	0,981	0,009*
0 mM - 40 mM	0,077	0,282	0,000*
0 mM - 85 mM	0,00*	0,00*	0,000*
0 mM - 100 mM	0,00*	0,00*	0,000*
20 mM - 40 mM	0,33	0,546	0,067
20 mM - 85 mM	0,001*	0,00*	0,042*
20 mM - 100 mM	0,00*	0,00*	0,017*
40 mM - 85 mM	0,017*	0,002*	0,998
40 mM - 100 mM	0,001*	0,00*	0,900
85 mM - 100 mM	0,239	0,003*	0,976

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé (p<0,05)

b) Triglicéridos: La Figura 7 muestra el contenido de triglicéridos (en mg/mL de extracto lipídico) en diferentes secciones de plantas de tomate de 30 días mantenidas en diferentes condiciones de salinidad. Al igual que en el caso de lípidos totales, se puede observar que el contenido de triglicéridos aumenta junto con las concentraciones de sal en la solución de riego, mientras que en la raíz más bien disminuye. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$, Tabla XII) y el análisis de comparación múltiple (Tabla XIII) mostraron diferencias significativas también similares con respecto a lo observado en las determinaciones de lípidos totales.

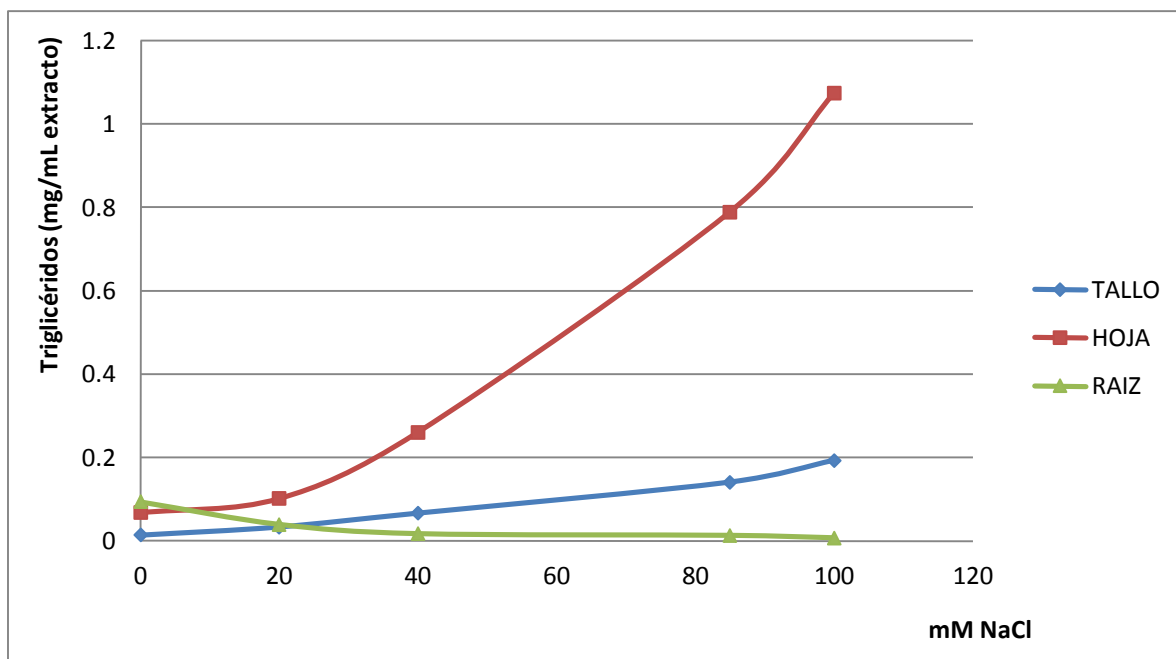


Figura 7. Contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes condiciones de Salinidad.

Tabla XII. Análisis estadístico del contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

[NaCl]	TALLO*		HOJA**		RAÍZ***	
	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)
0 mM	0.014 \pm 0.002	14.268	0.068 \pm 0.012	17.220	0.094 \pm 0.017	18.564
20 mM	0.034 \pm 0.006	19.094	0.102 \pm 0.014	13.936	0.040 \pm 0.004	10.783
40 mM	0.067 \pm 0.015	21.983	0.261 \pm 0.070	26.989	0.017 \pm 0.004	23.588
85 mM	0.141 \pm 0.014	9.899	0.789 \pm 0.062	7.856	0.013 \pm 0.003	20.376
100 mM	0.193 \pm 0.016	8.482	1.073 \pm 0.064	5.923	0.007 \pm 0.001	7.056

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,000

***p valor por prueba Anova = 0,000

Tabla XIII. Comparaciones múltiples del contenido de triglicéridos en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM - 20 mM	0,454	0,952	0,00*
0 mM - 40 mM	0,005*	0,015*	0,00*
0 mM - 85 mM	0,00*	0,00*	0,00*
0 mM - 100 mM	0,00*	0,00*	0,00*
20 mM - 40 mM	0,082	0,046*	0,092
20 mM - 85 mM	0,00*	0,00*	0,041*
20 mM - 100 mM	0,00*	0,00*	0,012*
40 mM - 85 mM	0,00*	0,00*	0,985
40 mM - 100 mM	0,00*	0,00*	0,719
85 mM - 100 mM	0,006*	0,01*	0,940

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé (p<0,05)

c) Esteroles: La Figura 8 muestra los contenidos de esteroides (en mg/mL de extracto lipídico) en hoja, tallo y raíz de plantas de tomate de 30 días mantenidas en diferentes condiciones de salinidad, observándose un incremento marcado

en hojas y una disminución gradual en raíz a medida que aumenta la concentración de sal en la solución de riego.

Es notorio observar que el aumento en hojas es gradual hasta los 40 mM de sal, tiende a mantenerse constante hasta los 85 mM para luego disminuir a los 100 mM. En la raíz, la disminución es muy marcada también hasta los 40 mM de NaCl, con una tendencia constante hasta los 85 mM para luego disminuir nuevamente a los 100 mM. El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p < 0,05$, Tabla XIV) y la comparación múltiple también señaló diferencias significativas, sobre todo en raíz (Tabla XV).

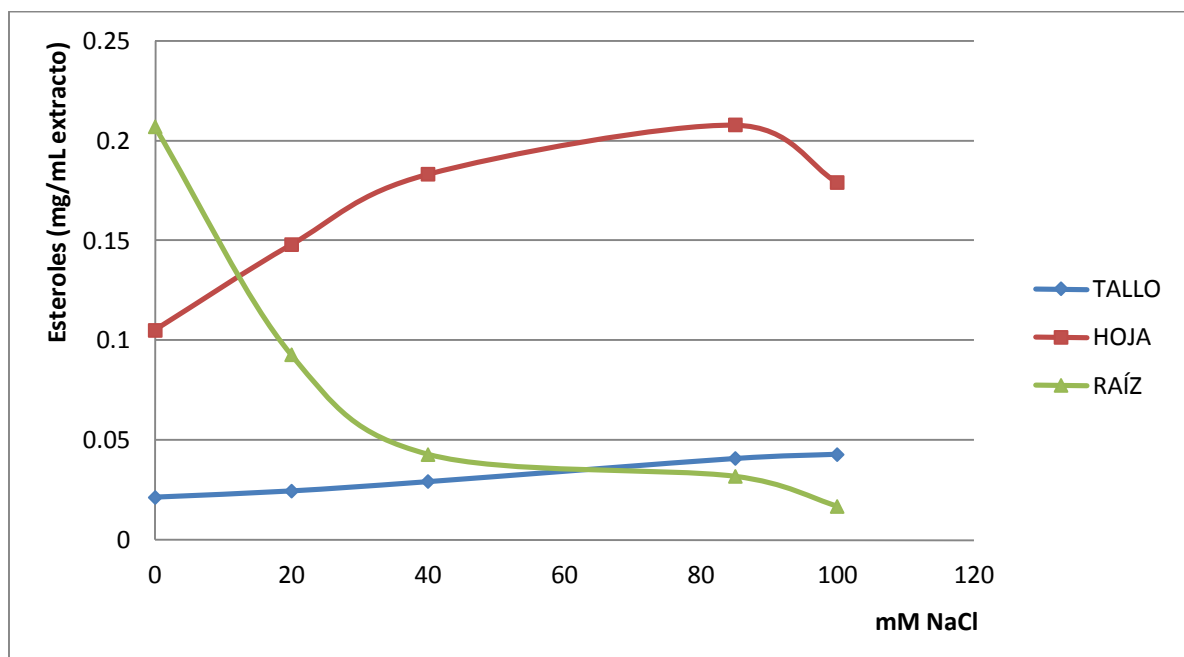


Figura 8. Contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días con soluciones de riego con diferentes condiciones de Salinidad.

Tabla XIV. Análisis estadístico del contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

	TALLO*		HOJA**		RAÍZ***	
(NaCl)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)	$\bar{X} \pm DS$	CV (%)
0 mM	0.021 \pm 0.003	13.238	0.105 \pm 0.022	20.601	0.207 \pm 0.026	12.613
20 mM	0.024 \pm 0.003	13.603	0.148 \pm 0.012	8.299	0.093 \pm 0.007	7.510
40 mM	0.029 \pm 0.002	6.544	0.183 \pm 0.013	7.050	0.043 \pm 0.008	18.239
85 mM	0.041 \pm 0.009	22.365	0.208 \pm 0.036	17.384	0.032 \pm 0.004	13.207
100 mM	0.043 \pm 0.002	5.593	0.179 \pm 0.031	17.168	0.017 \pm 0.001	7.358

*p valor por prueba Anova = 0,001

**p valor por prueba Anova = 0,004

***p valor por prueba Anova = 0,000

Tabla XV. Comparaciones múltiples del contenido de esteroides en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MÚLTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA		
	TALLO	HOJA	RAÍZ
0 mM - 20 mM	0,952	0,393	0,00*
0 mM - 40 mM	0,444	0,040*	0,00*
0 mM - 85 mM	0,008*	0,007*	0,00*
0 mM - 100 mM	0,004*	0,053	0,00*
20 mM - 40 mM	0,829	0,569	0,011*
20 mM - 85 mM	0,025*	0,139	0,003*
20 mM - 100 mM	0,012*	0,669	0,001*
40 mM - 85 mM	0,133	0,82	0,882
40 mM - 100 mM	0,062	1,00	0,256
85 mM - 100 mM	0,987	0,730	0,725

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé (p<0,05)

4.2.4. Efecto del estrés salino sobre el metabolismo de minerales:

La Figura 9 muestra el contenido de minerales de las plantas de tomate mantenidas por 30 días bajo diferentes condiciones de salinidad. Se puede apreciar que el sodio (Fig. 9A) se eleva gradualmente a medida que aumenta el

nivel de sal de la solución de riego, sobre todo en hojas, mientras que en raíz el incremento recién se hace notorio por encima de los 85 mM. En el caso del potasio (Fig. 9B) se puede apreciar que los niveles van descendiendo gradualmente en hojas a medida que aumenta el nivel de salinidad y que en raíz el contenido de este mineral desciende a partir de los 40 mM de sal en el medio. Los niveles de calcio (Fig. 9C) y magnesio (Fig. 9D) aumentan recién en los cultivos mantenidos a 40 mM y 85 mM de salinidad, a excepción de los niveles de magnesio en tallo, donde no se observa un mayor incremento.

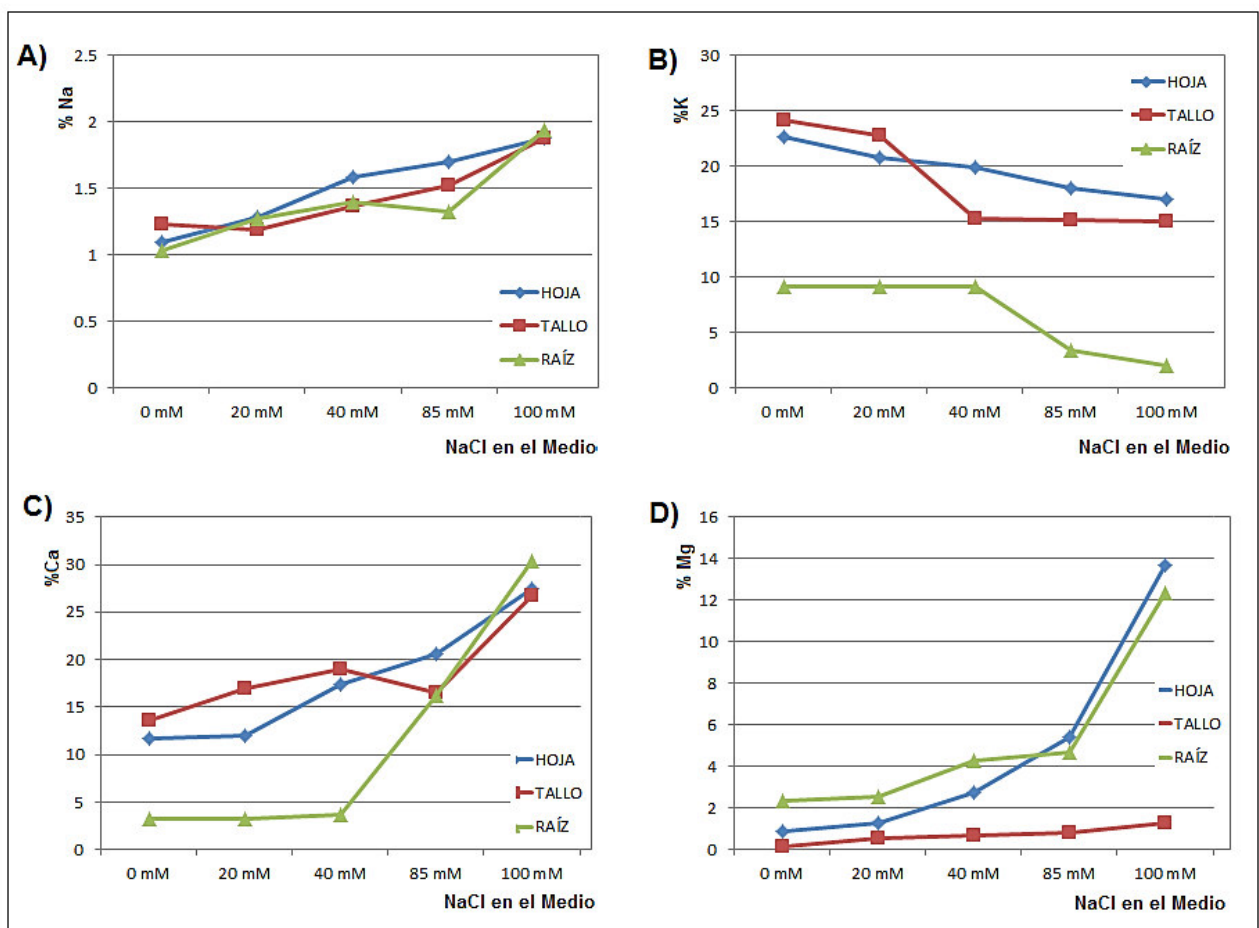


Figura 9. Contenido de Sodio (A), Potasio (B), Calcio (C) y Magnesio (D) de plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes niveles salinidad.

El análisis estadístico determinó la presencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de todos estos elementos (Tablas XX, XXII, XXIV, Anexo III), mientras que el análisis de comparación de Scheffé mostró diferencias significativas cuando las comparaciones se realizaban con los mayores niveles de salinidad (85 y 100 mM) en hoja, tallo y raíz para el caso de calcio y magnesio, mientras que en el caso de sodio, las diferencias significativas fueron detectadas en hoja y raíz cuando las comparaciones se realizaron con mayores condiciones de salinidad. En el caso de potasio, solo se observaron diferencias significativas en raíz cuando las comparaciones se hicieron con las condiciones de 85 mM y 100 mM de sal (Tablas XXI, XXIII, XXV, Anexo III).

En la Figura 10 se observan los resultados del Experimento 2 en cuanto al contenido de minerales en hojas superiores, medias e inferiores, de cultivos de tomate mantenidos hasta por 130 días en estrés salino (85 mM) y en medio Normal (0 mM de NaCl). Se puede observar un incremento gradual de calcio, sobre todo en hoja media y superior en condiciones de estrés salino (Fig. 10B), mientras que en plantas normales el incremento fue significativo en hojas inferiores (Fig. 10A). Con respecto al sodio, el estrés salino genera un incremento de este mineral en los tres tipos de hojas con el paso del tiempo (Fig. 10D), llegando a un nivel máximo a los 105 días, mientras que los niveles de sodio siguen aumentando con los días de cultivo en Medio Normal (Fig. 10C). En cuanto al potasio, se puede observar una disminución gradual con el paso del tiempo en plantas mantenidas con Medio Normal (Fig. 10E), mientras que en plantas con estrés salino (Fig. 10F) la disminución es gradual hasta los 70 días, para luego retardar el descenso. Respecto al magnesio, se puede observar que, en hojas superiores, los niveles de este elemento se mantienen casi constantes

en ambos medios, mientras que en hoja media la tendencia es aumentar con el tiempo en Medio Normal (Fig. 10G) mientras que en estrés salino (Fig. 10H) el incremento de este mineral en hoja media comienza a partir del día 105 de cultivo. En hoja inferior se puede observar que en Medio Normal hay un aumento de magnesio con respecto al tiempo de cultivo, mientras que en Medio Salino, disminuye gradualmente. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al día de extracción para el contenido de calcio, sodio y potasio, mientras que para magnesio, las diferencias no lo fueron. Respecto al tipo de muestras de hojas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el contenido de sodio y magnesio (Tablas XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, Anexo III).

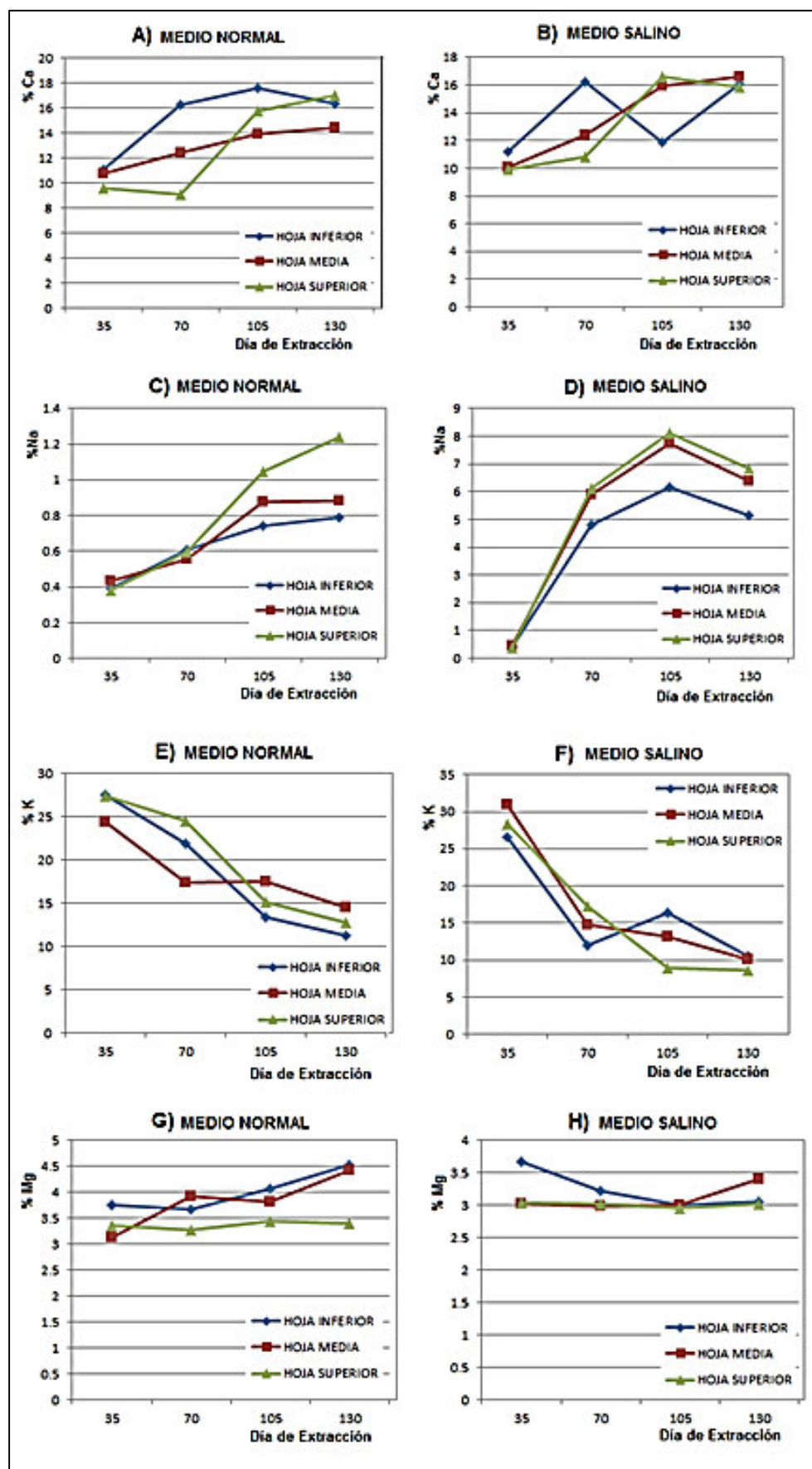


Figura 10, Comparación del contenido de minerales en hojas de tomate bajo estrés salino.

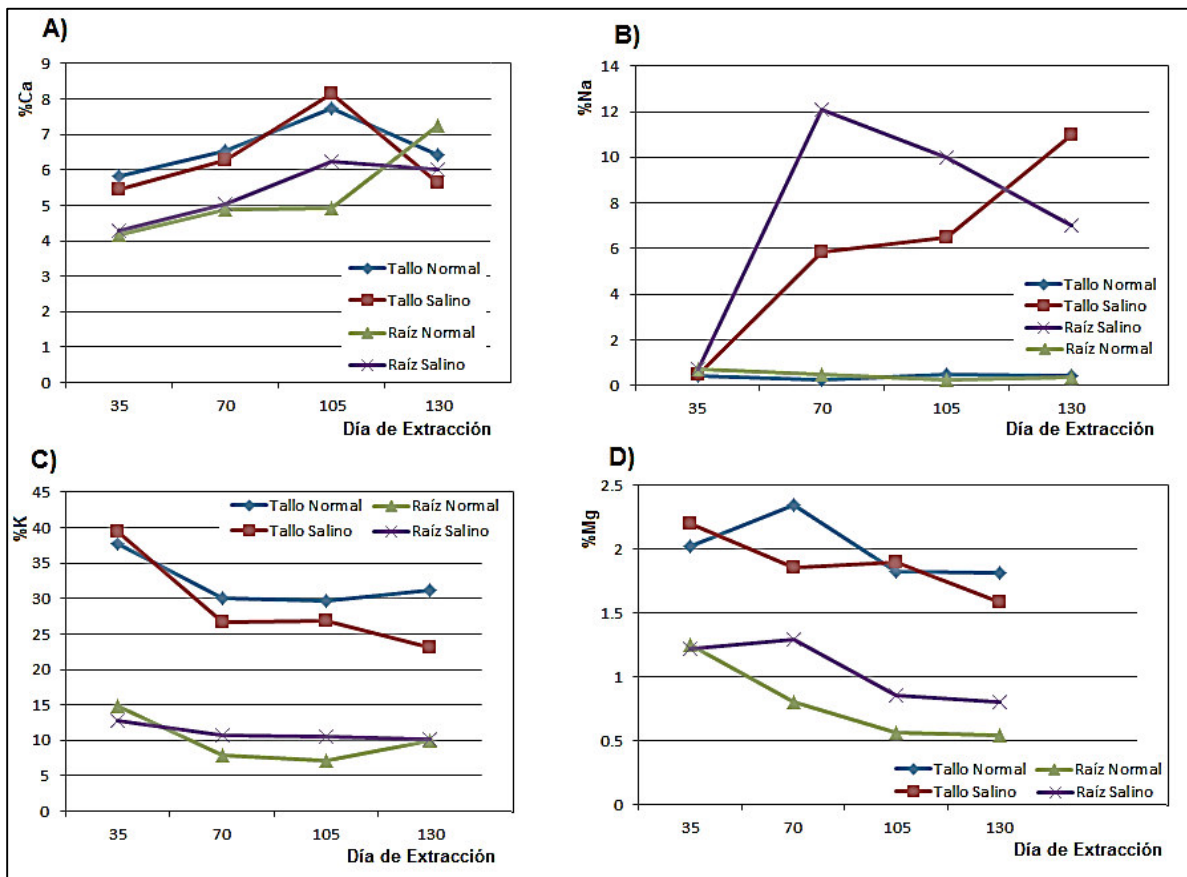


Figura 11. Comparación del contenido de minerales en tallos y raíces de tomate bajo estrés salino.

La figura 11 muestra la variación del contenido de minerales en tallos y raíces de plantas de tomate en estrés salino (85 mM) a comparación del contenido de plantas mantenidas con Solución Normal. Se puede observar que los niveles de calcio en el tallo son independientes del contenido de sal en el medio (Fig. 11A) al igual que el contenido de potasio (Fig. 11B) y el de magnesio (Fig. 11D), mientras que el contenido de sodio es mucho mayor en las plantas en estrés salino que en las plantas normales (Fig. 11C). Estos datos se corroboran con el análisis estadístico (Tablas XXXII a XXXV, Anexo III), en el cual sólo se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el análisis de calcio con

respecto al tiempo de extracción, mientras que no se obtuvieron diferencias consistentes para sodio ($p=0,052$). Respecto al tipo de muestra, en todos los casos se obtuvieron diferencias significativas.

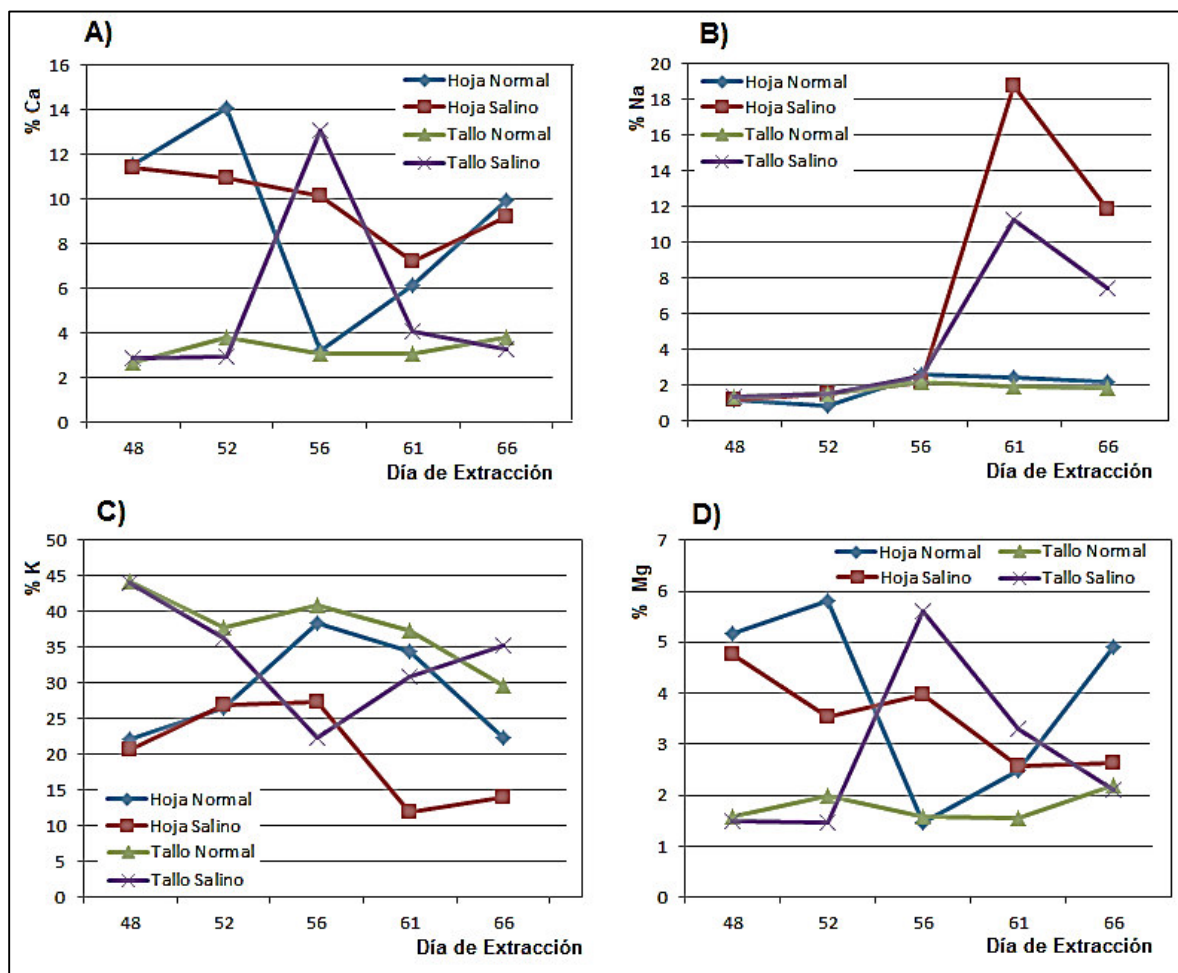


Figura 12. Recuperación del contenido de minerales en hojas y tallos de tomate en estrés salino y en condiciones normales.

La Figura 12 muestra los resultados del experimento de recuperación de plantas en estrés salino, las cuales fueron devueltas a un medio normal. Se midieron los contenidos de calcio, sodio, potasio y magnesio. Se puede observar que el contenido de sodio en tallo y raíz fue aumentando con el tiempo de exposición a

85 mM de NaCl en la solución de riego, pero cuando las plantas en estrés fueron lavadas y regadas con Solución Normal, los niveles comenzaron a descender significativamente. En el caso del calcio, se puede observar que la tendencia en hojas es de descender los niveles con el tiempo, aunque la pendiente era menos pronunciada en el caso de las plantas en estrés salino. Cuando se realizó el proceso de recuperación, los niveles de este mineral tienden a recuperarse respecto al contenido inicial. Respecto al potasio, se puede observar que el contenido de este mineral tiene un comportamiento inverso al contenido de sodio sobre todo en el caso de hojas de plantas en estrés salino. Respecto al contenido de magnesio, se puede observar que en hojas de plantas regadas con Solución Normal, los niveles de este mineral tienden a recuperarse con el tiempo. En cambio, en las plantas con estrés salino no se aprecia este proceso de recuperación, aún después del lavado y el regado con Solución Normal, ya que los niveles de este elemento mantienen una tendencia decreciente. Con respecto al tipo de muestra, a excepción del contenido de sodio ($p > 0,05$), los valores obtenidos con los otros elementos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) mientras que respecto al tiempo de extracción, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas para ninguno de los cuatro elementos ($p > 0,05$, Tablas XXXVI a XXXIX, Anexo III).

4.2.5. Efecto del estrés salino sobre la composición del fruto:

Cuando se calculó el contenido de azúcares reductores en frutos de tomate (Tabla XVI), se pudo observar que en todos los casos el contenido de azúcares aumentó en función del tiempo de cosecha, y que en las plantas mantenidas con soluciones estresantes de sal (85 mM), el contenido de azúcares reductores fue

siempre mayor que en plantas mantenidas con Solución Normal. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla XVI. Contenido de azúcares reductores (en mg/g peso seco) en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.

Día de cosecha	Normal*			NaCl 85 mM**		
	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)
70	91.58	7.23	7.89	100,35	3.72	3.71
105	97.41	5,06	5.20	192.67	37.91	19.68
130	184.94	20,85	11.27	269,01	39.85	14.81

*p valor por prueba Anova = 0,000

**p valor por prueba Anova = 0,002

La Tabla XVII muestra los valores de conductividad eléctrica (en mmho) medidos en los frutos de tomate en condiciones normales y de estrés salino, observándose que, para los frutos normales, la conductividad disminuye si se compara la primera y la tercera cosecha, aunque el valor fue mayor en la segunda cosecha. En los frutos de plantas en estrés salino, la conductividad de la segunda cosecha también fue mayor pero, a diferencia de las plantas en Solución Normal, la tendencia más bien fue de aumentar entre la primera y la tercera cosecha. Es interesante resaltar que en la segunda cosecha siempre se obtuvo una mayor conductividad eléctrica en los frutos independientemente de si pertenecían a plantas normales o en estrés salino. Por otro lado, cabe resaltar que, en todas las cosechas, la conductividad eléctrica siempre fue mayor en frutos de plantas en estrés salino que en los frutos normales. El análisis estadístico mostró diferencias no significativas ($p > 0,05$), tanto para los valores de plantas normales como de plantas en estrés salino.

Tabla XVII. Valores de conductividad eléctrica en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.

Día de cosecha	NORMAL*			SALINO**		
	Promedio	D.S.	C.V. (%)	Promedio	D.S.	C.V. (%)
70	46.36	0,27	0,58	67.94	10,26	15.10
105	50,88	4.18	8.22	82.89	9.78	11.80
130	43.41	5.13	11.81	69.69	11.84	17,00

*p valor por prueba Anova = 0,13

**p valor por prueba Anova = 0,25

La Tabla XVIII muestra los valores de pH del jugo de tomate en condiciones normales y en estrés salino. Se puede observar que en los frutos normales, el valor de pH desciende con el tiempo de cosecha, mientras que en frutos de plantas en estrés salino, más bien el pH tiende a aumentar con el tiempo de cosecha, siendo menor que los frutos normales en la primera cosecha para ser mayor que los frutos normales en la segunda y tercera cosechas. En ambas condiciones de cultivo, las diferencias no fueron significativas estadísticamente ($p>0,05$).

Tabla XVIII. Valores de pH en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.

Día de cosecha	NORMAL			SALINO		
	PROMEDIO	D.S.	C.V. (%)	PROMEDIO	D.S.	C.V. (%)
70	5.46	0,74	13.51	4.32	0,79	18.37
105	4.53	0,30	6.55	4.71	0,40	8.53
130	4.50	0,20	4.49	5.15	0,65	12.66

*p valor por prueba Anova = 0,078

**p valor por prueba Anova = 0,347

La Tabla XIX muestra el contenido de minerales en frutos de plantas normales y en estrés salino, observándose un mayor contenido de calcio en frutos normales, mientras que en estos frutos los niveles de potasio y magnesio fueron mayores en la primera cosecha para ser mayores en los frutos de plantas en estrés salino en la segunda cosecha. También en los frutos de plantas en estrés se puede observar un mayor contenido de sodio en las dos cosechas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en los contenidos de sodio y de magnesio.

Tabla XIX. Contenido de minerales en frutos de tomate en diferentes tiempos de cosecha.

		MEDIO NORMAL			MEDIO SALINO		
Día Cosecha	de	C.V.					
		Promedio	D.S.	(%)	Promedio	D.S.	C.V. (%)
Calcio (1)					(2)		
Día 70		0,95	0,15	16.19	0,54	0,02	3.17
Día 105		1,04	0,23	21.96	0,69	0,16	23.46
Sodio (3)					(4)		
Día 70		0,28	0,04	14.52	2.48	0,27	11,02
Día 105		3.13	0,31	9.92	5.86	1.21	20,65
Potasio (5)					(6)		
Día 70		48.85	7,03	14.40	35.72	1.21	3.39
Día 105		38.72	5.56	14.37	39.83	4.60	11.55
Magnesio (7)					(8)		
Día 70		2.70	0,25	9.14	1.17	0,11	9,08
Día 105		1.46	0,25	17.10	1.56	0,10	6.53

p valor por prueba Anova:

(1) 0,617	(2) 0,195
(3) 0,000	(4) 0,009
(5) 0,122	(6) 0,209
(7) 0,004	(8) 0,010

CONCLUSIONES

1. El sistema de cultivo semihidropónico utilizado en la presente tesis permite estudiar los cambios metabólicos y fisiológicos que ocurren en plantas de tomate que se encuentran en estrés salino, comparándolos con la información a nivel celular y molecular que existe en la literatura.
2. Los cambios en el contenido de minerales, proteínas, carbohidratos y lípidos permiten confirmar que, para la variedad Río Grande, la mínima concentración de NaCl en la que se pueda considerar que las plantas de tomate se encuentren en estrés salino es de 85 mM.
3. Los cambios metabólicos iniciales que se generan en las plantas que están en estrés salino fueron la disminución de almidón, clorofila y potasio, así como el incremento de calcio, magnesio y proteínas.
4. El estrés salino genera en primer lugar la acumulación tóxica de sodio, lo que desequilibra los niveles de diferentes elementos como calcio, potasio y magnesio. De todos ellos, la disminución de potasio sería el principal

mediador de los cambios en el metabolismo de azúcares, proteínas y lípidos.

5. No se pudo relacionar la disminución de magnesio en las plantas en estrés salino con la variación del contenido de clorofilas, por lo que este fenómeno más sería un efecto fisiológico (cierre estomático, disminución del área foliar) que metabólico (síntesis de pigmentos). El rol del magnesio sería principalmente de cofactor del metabolismo energético.
6. El metabolismo de minerales en estrés salino está regulado de manera rápida (a corto plazo) para el caso del sodio, calcio y potasio, mientras que en el caso del magnesio, el control de su concentración en las plantas debe estar mediado por mecanismos a mediano o largo plazo.
7. Los cambios metabólicos producidos por el estrés salino generan cambios en el pH y la conductividad eléctrica, quizá debido a una acumulación de sodio, azúcares reductores y ácidos orgánicos, parámetros que se reflejarían en las diferencias de calidad organoléptica de los frutos.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso de cultivos hidropónicos como modelo de experimentación para realizar estudios moleculares del efecto del estrés salino sobre las plantas de tomate.
2. Se recomienda realizar más experimentos en relación a la recuperación a corto plazo de las plantas de tomate en estrés salino, sobre todo con respecto al metabolismo de proteínas, lípidos, prolina y azúcares reductores y metabolitos secundarios como vitamina C o licopeno.
3. Se recomienda realizar mayores estudios respect al cambio de la calidad nutricional (contenido de metabolitos secundarios) y organoléptica del fruto del tomate en estrés salino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addai, I. K.; Scott, P. 2011. Regulation of carbohydrates partitioning and metabolism of the common hyacinth. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2(2): 279 - 297.
- Akça, Y.; Samsunlu, E. 2012. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline. and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut. *Pak. J. Bot.*, 44(5): 1513-1520.
- Ali, Y.; Aslam, S.; Ashraf, M.Y.; Tahir, G.R. 2004. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *International Journal of Environmental Science & Technology.* 1(3): 221 - 225.

- Almodares, A.; Hadi, M.R.; Dosti, B. 2008. The effects of salt stress on growth parameters and carbohydrates content in sweet sorghum. *Research Journal of Environmental Sciences*. 2(4): 298 – 304.
- Amirjani, M.R. 2010. Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *EJBS*. 3(1): 06 - 16.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*. 24(1): 1 – 15.
- Asulabh, K.S.; Supriya, G.; Ramachandra, T.V. 2012. Effect of salinity concentrations on growth rate and lipid concentration in *Microcystis* sp., *Chlorococcum* sp. and *Chaetoceros* sp. *National Conference on conservation and management of wetland ecosystems*. http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/lake2012/fullpaper/asulabh_fullpaper.pdf (revisado el 15-01-2013).
- Ávalos, A.; Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119 - 145. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>, (revisado el 12-03-2012).
- Azcon-Bieto, J.; Talon, M. 1996. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Ed. Interamericana, Madrid.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P. y Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 29: 205 – 207.
- Berry, W.; Knight, S. 1997. Chapter 8: Plant culture in hydroponics. En: Langhans, R.W.; Tibbitts, T.W. (Eds.). *Plant growth chamber handbook*.

North Central Regional Research Publication No. 340. *Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report* No. 99. 119 – 131.

- Boriboonkaset, T.; Theerawitaya, C.; Pichakum, A.; Cha-um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. 2012. Expression levels of some starch metabolism related genes in flag leaf of two contrasting rice genotypes exposed to salt stress. *Australian Journal of Crop Science*. 6(11):1579 – 1586.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248 – 254.
- Casierra, F.; Eberf, G.; Lüdders, P. 2000, Efecto de la salinidad por Cloruro de Sodio sobre el balance de nutrientes en plantas de Lulo (*Solanum quitoense* L.). *Agronomía Colombiana*. 17: 85 - 90,
- Chaman, M.; Veneros, R.; E. Araujo; Ramírez, A.; Hidalgo, J.; Alaya, B.S.L.; Ramos, C. 2014. Contenido de prolina en *Solanum lycopersicum* pretratado con glicina betaina y sometido a estrés salino. *REBIOL*. 34(1): 19 - 25.
- Chapman, K.C.; Dyer, J.M.; Mullen, R.T. 2012. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. *Journal of Lipid Research*. 53: 215 - 226.
- Chávez, L.; González, L.M. 2009. Mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de las plantas a la salinidad. *Separata ITEA*. 105(4): 231 – 256.

- Conn, S.J.; Hocking, B.; Dayod, M.; Xu, B.; Athman, A.; Henderson, S.; Aukett, L.; Conn, V.; Shearer, M.K.; Fuentes, S.; Tyerman, S.D.; Gilliam, M. 2013. Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*. 9: 4. <http://www.plantmethods.com/content/pdf/1746-4811-9-4.pdf>. (Revisado 21/01/2015).
- Coombs, J.; Hall, D.O. 1985. Techniques in bioproductivity and photosynthesis. 2ª Ed. Pergamon Press. Oxford.
- De Lucena, C.C.; De Siqueira, D.L.; Prieto Martinez, H.E.; Cecon, P.R. 2012. Salt stress change chlorophyll fluorescence in mango. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP*. 34(4): 1245 - 1255.
- Deivanai S.; Xavier, R.; Vinod, V.; Timalata, K.; Lim, O.F. 2011. Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 7(4): 158 – 174.
- Díaz, F.; Salas, R. 2007. Contenido de materia seca, azúcares, proteínas y prolina en *Lycopersicon pimpinellifolium* y *Lycopersicon esculentum* en respuesta a condiciones de salinidad. *Revista Científica*. 4(4): 24 – 34.
- Dombrowski, J.E. 2003. Salt Stress Activation of Wound-Related Genes in Tomato Plants. *Plant Physiology*. 132: 2098 – 2107.
- Falen, J.M. Manual de práctica de Bioquímica. 1982. Lima; Editorial de la Universidad Nacional Federico Villarreal. 78 p.

- Fernandes, F.M.; Arrabaça, M.C.; Carvalho, L.M.M. 2004. Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress. *Biologia Plantarum*. 48(2): 317 - 319.
- Flexas, J.; Medrano, H. 2002. Drought inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. 89: 183 – 189.
- García, M.; Medina, E. 2009. Acumulación de iones y solutos orgánicos en dos genotipos de caña de azúcar, estresados con sales simples o suplementados con calcio. *BioAgro*. 21(1): 3 – 14.
- García, M.A. 2010, Estudio de la participación de genes claves de la biosíntesis de lípidos en el desarrollo de desórdenes fisiológicos en palta Cv. Hass. Tesis para Magíster en Biotecnología. Santiago – Chile Universidad Andrés Bello.
- Gigon, A.; Matosy, A.R.; Laffray, D.; Zuily-Fodil, Y; Pham-Thi, A.T. 2004. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*. 94: 345 – 351.
- Gupta, A.K.; Kaur, N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30(5): 761 – 776.
- Hanson, A.D.; Rathinasabapathi, B.; Rivoal, J.; Burnet, M.; Dillon, M.O.; Gage, D.A. 1994. Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 306 - 310,

- Hao, D.; Demers, A. y Papadopoulos, A.P. 1999. Improvement of tomato fruit quality by increasing the EC of the nutrient solutions with NaCl. *Annual Report of the Harrow Greenhouse Vegetable Research Advisory Committee*.
- Hare, P.D.; Cress, W.A.; Van Staden, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*. 21: 535 – 553.
- Heyer, A.G. 2000. Chapter 5: Engineering carbohydrate metabolism in transgenic plants. En: Watanabe, K.; Komamine, A., eds. *Proceedings of the 12th Toyota Conference: Challenge of Plant and Agricultural Sciences: To the Crisis of Biosphere on the Earth in the 21st Century*.
- Javid, M.G.; Sorooshzadeh, A.; Moradi, F.; Sanavy, S.A.M.M.; Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*. 5(6): 726 - 734.
- Jaleel, C.A.; Sankar, B.; Sridharan, R.; Panneerselvam, R. 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.* 32: 79 – 83.
- Jamil, M.; Rha, E.S. 2013. NaCl stress-induced reduction in growth, photosynthesis and protein in mustard. *Journal of Agricultural Science*. 5(9): 114 – 127.
- Jouyban, Z. 2012. The Effects of Salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2(1): 7 - 10,

- Katsuhara, M.; Yazaki, Y.; Sakano, K.; Kawasaki, T. 1997. Intracellular pH and Proton-Transport in Barley Root Cells under Salt Stress: in Vivo ³¹P-NMR Study. *Plant Cell Physiol.* 38(2): 155 - 160,
- Kavi Kishor, P.B.; Sangam, S.; Amrutha, R.N.; Sri Laxmi, P.; Naidu, K.R.; Rao, K.R.S.S.; Rao, S.; Reddy, K.J.; Theriappan, P.; Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science.* 88(3): 424 – 438.
- Khodary, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture & Biology.* 6(1): 5 – 8.
- Kosová, K.; Prášil, I.T.; Vítámvás, P. 2013. Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6757 - 6789.
- Krasensky, J.; Jonak, C. 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany.* 63: 1593 – 1608.
- Kumari, L.; Kanwar, S.S. 2012. Cholesterol Oxidase and Its Applications. *Advances in Microbiology.* 2: 49 - 65.
- Lange, Y. 1992. Tracking cell cholesterol with cholesterol oxidase. *Journal of Lipid Research.* 33: 315 – 321.
- Lara, A. 1999. Manejo de la solución nutritiva en la producción de tomate en hidroponía. *Terra.* 17(3): 221 – 229.

- Lawlor, D. 2002. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. Metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*. 8: 871 – 885.
- Lee, D.R.; Elgregen, J. 2007. Conservación de Recursos Naturales: Suelos, Recursos Forestales y Biodiversidad. Taller de Diseminación del Análisis Ambiental del Perú. CEA.
- Liu, J.; Zhu, J.K.. 1997. Proline Accumulation and Salt-Stress-Induced Gene Expression in a Salt-Hypersensitive Mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 114: 591 - 596.
- López-Mesas, M.; Crespi, M. 2000, Revisión de los métodos de extracción y purificación de pesticidas de muestras con alto contenido de materia grasa. *Grasas y Aceites*. 51(3): 183 - 189.
- López-Pérez, L.; Martínez-Ballesta, M.C.; Maurel, C.; Carvajal, M. 2009. Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity. *Phytochemistry*. 70: 492 – 500,
- Lu, S.; Li, T.; Jiang, J. 2010, Effects of salinity on sucrose metabolism during tomato fruit development. *African Journal of Biotechnology*. 9(6): 842 - 849.
- Manaa, A.; Mimouni, H.; Wasti, S; Gharbi, E.; Aschi-Smiti, S.; Faurobert, M.; Ben Ahmed, H. 2013. Comparative proteomic analysis of tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves under salinity stress. *PlantOmics Journal*. 6(4): 268 - 277.

- Molazem, D.; Qurbanov, E.M.; Dunyamaliyev, S.A. 2010. Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 9(3): 319 - 324.
- Nemoto, Y.; Sasakuma, T. 2000, Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science.* 158: 53 – 60,
- Netondo, G.W.; Onyango, J.C.; Beck, E. 2004. Sorghum and Salinity: I. Response of Growth, Water Relations, and Ion Accumulation to NaCl Salinity. *Crop Sci.* 44: 797 – 805.
- Oh, J.E.; Kim, Y.H.; Kim, J.H.; Kwon, Y.R.; Lee, H. 2011. Enhanced Level of Anthocyanin Leads to Increased Salt Tolerance in Arabidopsis PAP1-D Plants upon Sucrose Treatment. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54(1): 79 - 88.
- Ohlrogge, J.; Browse, J. 1995. Lipid Biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 957 – 970.
- Parvaiz, A.; Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54(3): 89 – 99.
- Pattanagul, W.; Thitisaksakul, M. 2008. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian Journal of Experimental Biology.* 46: 736 – 742.
- Ramadan, A.M.; Eissa, H.F.; Hassanein, S.E.; AbdelAzeiz, A.Z.; Saleh, O.M.; Mahfouz, H.T.; El-Domyati, F.M.; Madkour, M.A.; Bahieldin, A.

2013. Increased salt stress tolerance and modified sugar content of bread wheat stably expressing the *mtlD* gene. *Life Science Journal*. 10(2). 2348 – 2362. <http://www.lifesciencesite.com> (revisado 15-10-2013).
- Raymond, M.J.; Smirnov, N. 2002. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Annals of Botany*. 89: 813 – 823.
 - Reyes, Y.; Mazorra, I. M.; Núñez, M. 2008. Revisión bibliográfica. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la Tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cultivos Tropicales*. 29(4): 67 – 75.
 - Riccardi, F.; Gazeau, P.; de Vienne, D.; Zivy, M. 1998. Protein Changes in Response to Progressive Water Deficit in Maize: Quantitative Variation and Polypeptide Identification. *Plant Physiol*. 117: 1253 – 1263.
 - Richmond, W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem*. 19(12): 1350 - 1356.
 - Rodrigo, M.E. 1999. Cambios Fisiológicos y Morfológicos durante al estrés salino de cultivos hidropónicos de tomate variedad “Río Grande”. [Tesis para título]; Universidad Nacional Federico Villarreal. 85 p.
 - Rodrigo, M.; Salas, R. 2001. Parámetros de Crecimiento de cultivos hidropónicos de tomate en condiciones de estrés salino. *Boletín de Lima*. 23(124): 14 – 21.

- Rubio, J.S.; García-Sánchez, F.; Rubio, F.; García, A.L.; Martínez, V. 2010. The importance of K⁺ in ameliorating the negative effects of salt stress on the growth of pepper plants. *Europ.J.Hort.Sci.* 75(1)S: 33 – 41.
- Sairam, R. K.; Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science.* 86(3): 407 – 421.
- Salas, R.; Rodrigo, M.E.; Santa Cruz, C. 1999. Estrés salino y su efecto en el almacenamiento y movilización de azúcares en cultivos hidropónicos de tomate. *Wiñay Yachay.* 3(1): 35 – 42.
- Santos, C.V. 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae.* 103: 93 – 99.
- Schmid, K.M.; Ohlrogge, J.B. 2002. Lipid metabolism in plants. En: Vance, D.E.; Vance, J.E. (eds). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (4a. ed.). Amsterdam. Elsevier Science. Págs. 93 – 126.
- Sevengor, S.; Yasar, F.; Kusvuran, S.; Ellialtioglu, S. 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. *African Journal of Agricultural Research.* 6(21): 4920 - 4924.
- Shannon, M.C. 1992. The effects of salinity on cellular and biochemical processes associated with salt tolerance in tropical plants. En: Davenport, T.L. y Harrington, H.M. (eds.). *Proceedings of Plant Stress in the Tropical Environment.* Kailu-Kona, Hawaii. Págs. 56 – 63.

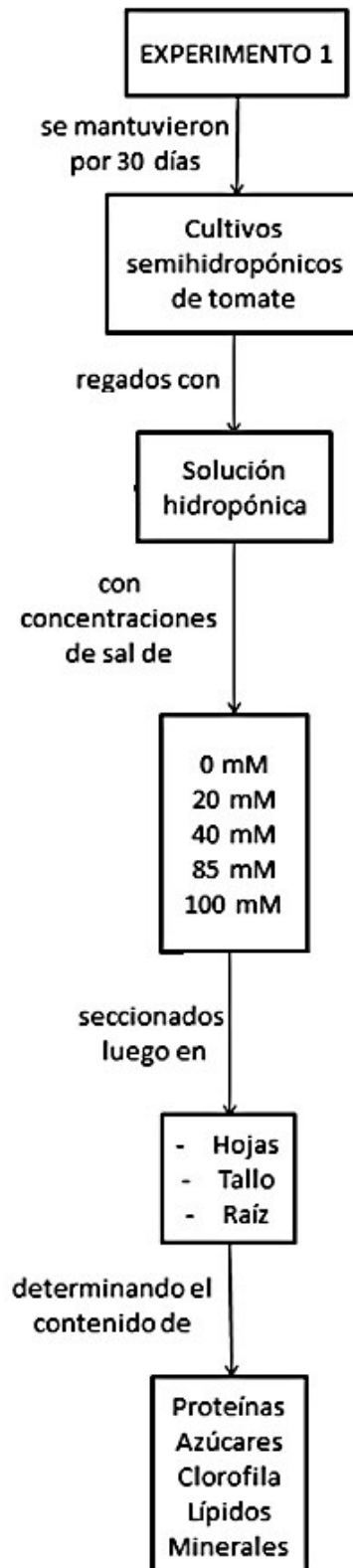
- Singh, N.; Handa, A.; Hasegawa, P. y R. Bressan. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 126 - 137.
- Siringam, K.; Juntawong, N.; Cha-um, S.; Kirdmanee, C. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) roots under isoosmotic conditions. *African Journal of Biotechnology.* 10(8): 1340 – 1346.
- Sorenson, R.; Relf, D. 2009. Home Hydroponics. Virginia Cooperative Extension, publication 426-084. <https://pubs.ext.vt.edu/426/426-084/426-084.html>. (Revisado el 15/08/2012).
- Sueldo, R.J.; Invernati, A.; Plaza, S.G.; Barassi, C.A. 1996. Osmotic stress in wheat seedlings: effects on fatty acid composition and phospholipid turnover in coleoptiles. *Cereal Research Communications.* 24(1): 77 – 84.
- Taffouo, V.D.; Nouck, A.H.; Dibong, S.D.; Amougou, A. 2010. Effects of salinity stress on seedlings growth, mineral nutrients and total chlorophyll of some tomato (*Lycopersicum esculentum* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology.* 9(33): 5366 - 5372.
- Turan, M.A.; Elkarim, A.H.A.; Taban, N.; Taban, S. 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *African Journal of Agricultural Research.* 4(9): 893 – 897.

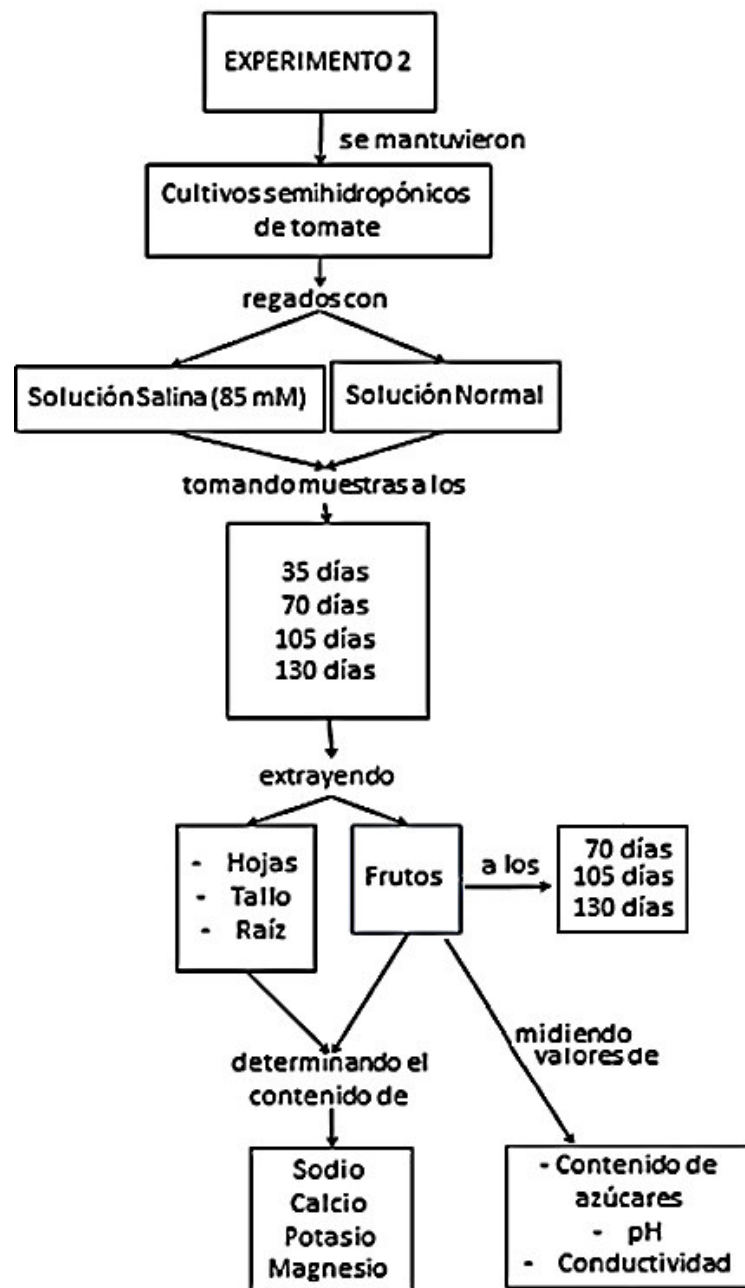
- Turan, S.; Tripathy, B.C. 2015. Salt-stress induced modulation of chlorophyll biosynthesis during de-etiolation of rice seedlings. *Physiologia Plantarum*. 153: 477 – 491.
- Ullah, S.M.; Gerzabek, M.H.; Soja, G. 1994. Effect of seawater and soil salinity on ion uptake, yield and quality of tomato (fruit). *Die Bodenkultur*. 45: 227 - 237.
- Vazan, S.; Torabi, S. 2013. Effects of sugar metabolism on NaCl stress in rice. *International Journal of Biosciences*. 3(7): 8 - 14.
<http://www.innspub.net> (revisado el 19-11-2013).
- Wiener S.A. 1990. *Vademécum de Pruebas de Laboratorio Clínico*. Buenos Aires. Argentina. 80 p.
- Williamson, J.D.; Jennings, D.B.; Guo, W.W.; Pharr, D. M.; Ehrenshaft, M. 2002. Sugar alcohols, salt stress and fungal resistance: Polyols – Multifunctional plant protection? *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127(4): 467 – 473.
- Wyn Jones, R.G. 1984. Phytochemical aspects of osmotic adaptation. *Recent Adv Phytochemistry* 18:55-78.
- Wu, J.; Seliskar, D.M.; Gallagher, J.I. 2005. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress. *American Journal of Botany*. 92(5): 852 – 858.
- Yan, S.; Tang, Z.; Su, W.; Sun, W. 2005. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*. 5: 235 – 244.

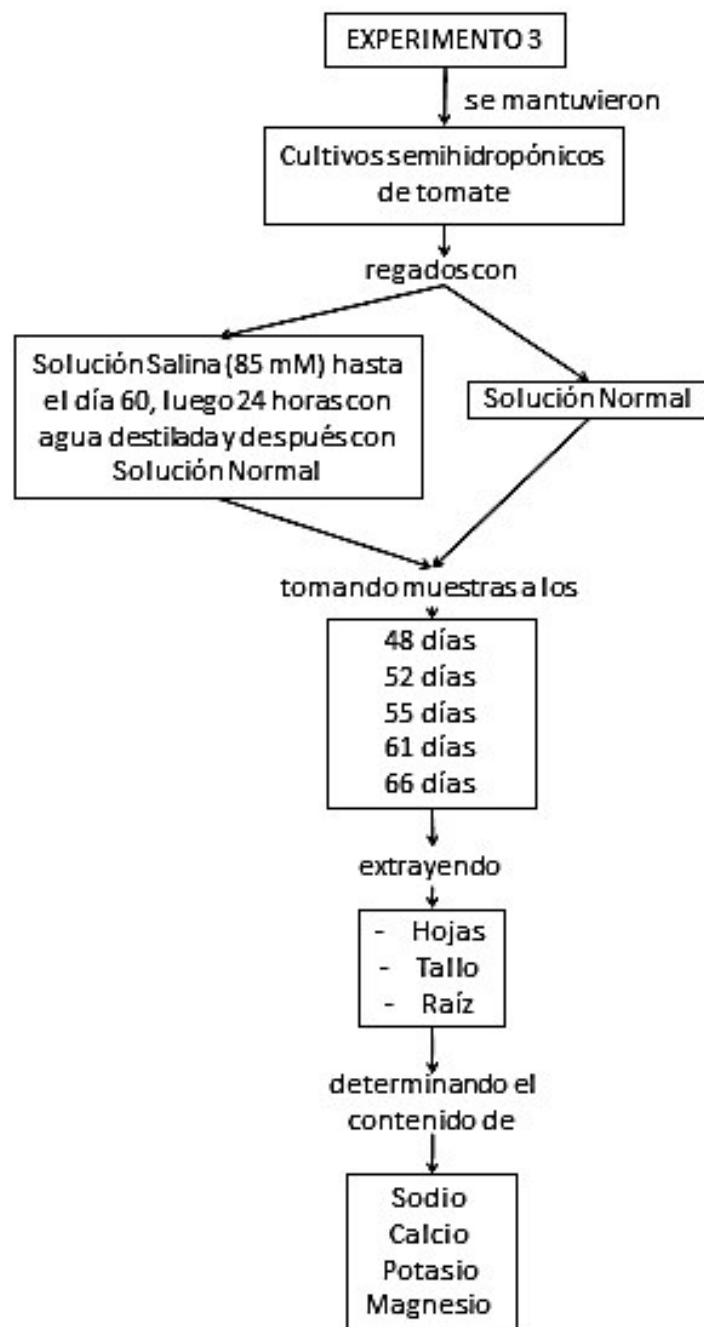
- Yasar, F.; Ellialtioglu, S.; Yildiz, K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*. 55(6): 782 – 786.
- Yu, W.L.; Ansari, W.; Schoepp, N.G.; Hannon, M.J.; Mayfield, S.P.; Burkart, M.D. 2011. Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories*. 10(91). <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/1/91> (revisado el 15-12-2012).
- Zamani, S.; Bybordi, A.; Khorshidi, M.B.; Nezami, T. 2010, Effects of NaCl salinity levels on lipids and proteins of Canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Advances in Environmental Biology*. 4(3): 397 - 403.
- Zepeda, A.I. 2010, Mecanismos de intercambio de K⁺ y Ca⁺ en epidermis de raíces bajo estrés salino. Tesis para el Grado de Doctor en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima. México. 72 pág.

ANEXO 1

Diagramas de flujo de los tres experimentos realizados







ANEXO II

Imágenes de los Cultivos de tomate utilizados en la presente Tesis.

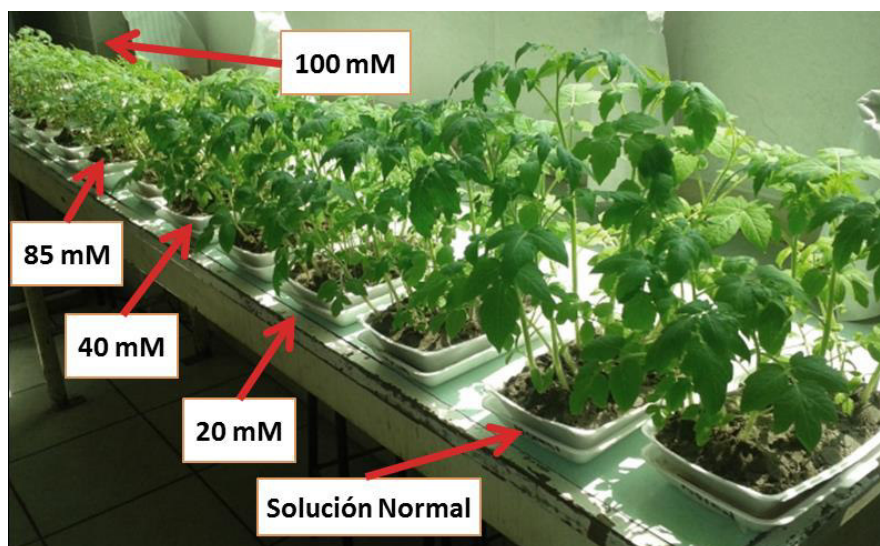


Figura 13. Cultivo semihidropónico de tomates en bandejas de tecnopor y en condiciones del laboratorio de Biotecnología UNFV.



Figura 14. Sistema de riego por capilaridad utilizado en los cultivos de tomate en bandejas de tecnopor.



Figura 15. Cultivo semihidropónico de tomate en baldes y en condiciones de invernadero.

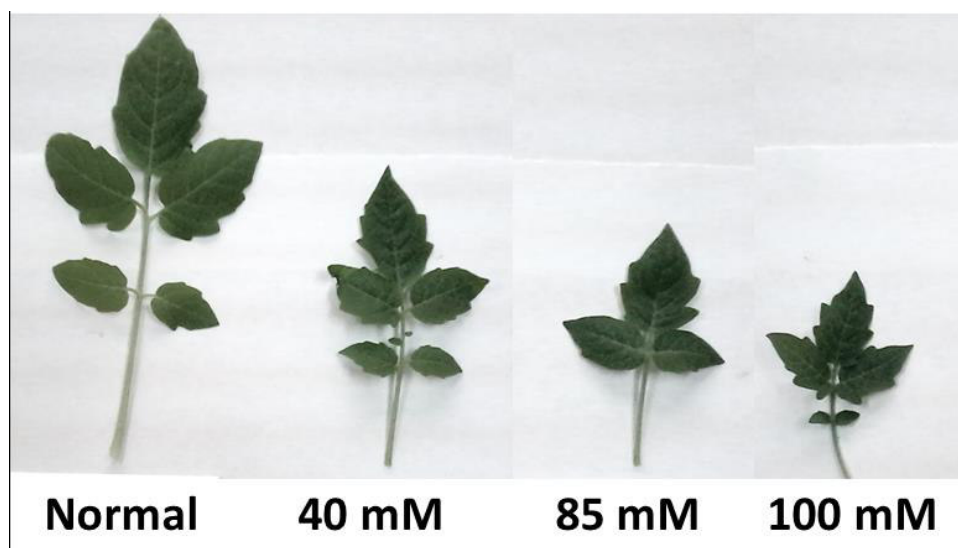


Figura 15. Comparación del tamaño y área de hojas de plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes niveles salinidad.

ANEXO III

Tabla XX. Análisis estadístico del contenido de Sodio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

mM NaCl	Hoja*			Tallo**			Raíz***		
	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)
0	1.1	0,15	13.9	1.23	0,11	9.15	1,03	0,15	14.52
20	1.28	0,2	15.93	1.19	0,1	8.63	1.27	0,08	6.66
40	1.58	0,09	5.68	1.37	0,28	20,6	1.4	0,14	9.92
85	1.7	0,11	6.45	1.53	0,24	15.7	1.32	0,15	11.36
100	1.88	0,3	16.22	1.88	0,37	19.45	1.94	0,19	9.78

* p valor por ANOVA = 0,003

** p valor por ANOVA = 0,034

*** p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXI. Comparaciones múltiples del contenido de sodio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MULTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		
	HOJA	TALLO	RAIZ
0 mM - 20 mM	0,84	1,00	0,452
0 mM - 40 mM	0,116	0,97	0,127
0 mM - 85 mM	0,04*	0,695	0,277
0 mM - 100 mM	0,009*	0,092	0,000*
20 mM - 40 mM	0,479	0,924	0,886
20 mM - 85 mM	0,197	0,586	0,995
20 mM - 100 mM	0,043*	0,068	0,004*

40 mM - 85 mM	0,958	0,955	0,982
40 mM - 100 mM	0,499	0,234	0,018*
85 mM - 100 mM	0,862	0,553	0,008*

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($P < 0,05$)

Tabla XXII. Análisis estadístico del contenido de Potasio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

mM NaCl	Hoja*			Tallo**			Raíz***		
	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)
0	22.71	2.85	12.56	24.21	0,62	2.57	9.12	1.83	20,12
20	20,79	0,21	1,01	22.83	3.97	17.39	9.12	1.62	17.8
40	19.86	1.67	8.42	15.24	2.9	19	9.12	0,98	10,78
85	17.98	1.75	9.76	15.15	2.48	16.36	3.36	0,32	9.66
100	17,01	2.48	14.58	15,05	4.43	29.4	1.98	0,29	14.67

* p valor por ANOVA = 0,040

** p valor por ANOVA = 0,008

*** p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXIII. Comparaciones múltiples del contenido de potasio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MULTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		
	HOJA	TALLO	RAIZ
0 mM - 20 mM	0,844	0,990	1,000
0 mM - 40 mM	0,579	0,073	1,000
0 mM - 85 mM	0,159	0,069	0,003*
0 mM - 100 mM	0,072	0,065	0,001*
20 mM - 40 mM	0,987	0,149	1,000
20 mM - 85 mM	0,589	0,142	0,003*

20 mM - 100 mM	0,326	0,135	0,001*
40 mM - 85 mM	0,852	1,000	0,003*
40 mM - 100 mM	0,579	1,000	0,001*
85 mM - 100 mM	0,985	1,000	0,737

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé (P<0,05)

Tabla XXIV. Análisis estadístico del contenido de Calcio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

mM NaCl	Hoja*			Tallo**			Raíz***		
	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)
0	11.63	1.78	15.28	13.63	1.17	8.55	3.16	0,59	18.7
20	11.92	1.14	9.55	17	1.53	9	3.3	0,76	22.95
40	17.33	2.13	12.28	19,04	2.13	11.2	3.61	0,58	16.22
85	20,63	2.87	13.9	16.55	3.25	19.66	16.21	3.97	24.5
100	27.42	2.1	7.65	26.73	0,71	2.67	30,31	3,06	10,09

* p valor por ANOVA = 0,000

** p valor por ANOVA = 0,000

*** p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXV. Comparaciones múltiples del contenido de calcio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MULTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		
	HOJA	TALLO	RAIZ
0 mM - 20 mM	1,000	0,407	1,000
0 mM - 40 mM	0,084	0,082	1,000
0 mM - 85 mM	0,006*	0,538	0,001*
0 mM - 100 mM	0,000*	0,000*	0,000*

20 mM - 40 mM	0,106	0,802	1,000
20 mM - 85 mM	0,007*	0,999	0,001*
20 mM - 100 mM	0,000*	0,002*	0,000*
40 mM - 85 mM	0,477	0,670	0,001*
40 mM - 100 mM	0,003*	0,012	0,000*
85 mM - 100 mM	0,034*	0,002*	0,000*

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé (P<0,05)

Tabla XXVI. Análisis estadístico del contenido de Magnesio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

mM NaCl	Hoja			Tallo			Raíz		
	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)	Promedio	DS	CV (%)
0	0,89	0,09	10,4	0,14	0,03	19.26	2.32	0,39	16.9
20	1.24	0,07	5.36	0,51	0,02	3.4	2.55	0,51	19.96
40	2.73	0,27	9.78	0,65	0,07	9.94	4.29	0,51	11.83
85	5.42	0,81	14.95	0,79	0,1	13.1	4.7	0,85	18,09
100	13.71	1.49	10,88	1.24	0,15	12.42	12.35	1.13	9.12

* p valor por ANOVA = 0,000

** p valor por ANOVA = 0,000

*** p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXVII. Comparaciones múltiples del contenido de magnesio en plantas de tomate mantenidas por 30 días en diferentes condiciones de salinidad.

COMPARACIONES MULTIPLES	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA		
	HOJA	TALLO	RAIZ
0 mM - 20 mM	0,988	0,008*	0,996
0 mM - 40 mM	0,150	0,001*	0,088

0 mM - 85 mM	0,001*	0,000*	0,034*
0 mM - 100 mM	0,000*	0,000*	0,000*
20 mM - 40 mM	0,301	0,477	0,151
20 mM - 85 mM	0,001*	0,045*	0,060
20 mM - 100 mM	0,00*	0,000*	0,000*
40 mM - 85 mM	0,024*	0,520	0,974
40 mM - 100 mM	0,000*	0,000*	0,000*
85 mM - 100 mM	0,000*	0,002*	0,000*

*Significancia estadística por prueba Post hoc Scheffé ($P < 0,05$)

Tabla XXVIII. Contenido de Calcio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Medio Normal									Medio Salino								
	Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior			Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	11.12	0,68	6.1	10,78	1.9	17.64	9.63	1.76	18.26	11.19	1.99	17.78	10,05	0,57	5.72	9.94	1,03	10,35
70	16.3	1.55	9.52	12.39	1.77	14.27	9,09	1.9	20,9	16.21	1,07	6.59	12.4	1.15	9.25	10,81	0,97	8.96
105	17.58	3.14	17.86	13.94	2.14	15.33	15.75	3.23	20,51	11.89	1.71	14.37	15.94	2,02	12.7	16.61	2.13	12.82
130	16.37	2.55	15.58	14.41	1.54	10,72	16.99	1.5	8.81	16.1	3.76	23.35	16.61	0,99	5.99	15.83	4,01	25.36

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,457

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXIX. Contenido de Sodio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Medio Normal									Medio Salino								
	Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior			Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	0,39	0,05	11.96	0,43	0,02	5.23	0,38	0,07	19.26	0,4	0,022	5.4	0,44	0,08	19,05	0,39	0,02	5.23
70	0,61	0,07	12.23	0,56	0,01	2.12	0,59	0,05	8.67	4.8	0,6	12.4	5.88	0,83	14.16	6.12	1.65	27
105	0,74	0,06	8.38	0,88	0,11	12.65	1,05	0,05	5.2	6.17	0,65	10,53	7.73	1,02	13.21	8.13	0,7	8.56
130	0,79	0,06	7.22	0,88	0,09	10	1.24	0,18	14.41	5.15	0,13	2.45	6.38	0,9	14,06	6.84	0,98	14.33

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXX. Contenido de Potasio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Medio Normal									Medio Salino								
	Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior			Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior		
	Medi a	DS	CV(%)	Medi a	DS	CV(%)	Medi a	DS	CV(%)	Medi a	DS	CV(%)	Medi a	DS	CV(%)	Medi a	DS	CV(%)
35	27.56	1.8 3	6.62	24.4	2.9 8	12.2	27.47	5.3	19.29	26.54	1.2 6	4.73	30,99	2.7 9	9	28.3	7.6 7	27,09
70	21.86	2.4 5	11.19	17.43	3.1 2	17.9	24.48	5.3	21.62	11.96	2.1 8	18.2	14.8	1.9 8	13.4	17.24	0,9 6	5.59
105	13.37	1,0 1	7.57	17.55	1,0 7	6.1	15,09	1.9 3	12.78	16.37	0,5 1	3.14	13.17	2.3 4	17.73	8.96	0,7 9	8.77
130	11.23	1.8 2	16.19	14.53	2,0 1	13.87	12.78	2.4 7	19.35	10,58	1.2 7	12,01	10,03	1.5 7	15.66	8.62	1.4 6	16.93

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,748

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,000

Tabla XXXI. Contenido de Magnesio en muestras de hojas de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Medio Normal									Medio Salino								
	Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior			Hoja Inferior			Hoja Media			Hoja Superior		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	3.75	0,5	13.34	3.13	0,59	18.87	3.36	0,5	14.9	3.68	0,48	13,02	3,03	0,25	8.22	3,04	0,56	18.33
70	3.67	0,02	0,58	3.91	0,43	11,09	3.28	0,47	14.27	3.22	0,38	11.9	2.99	0,21	7	3,01	0,33	10,97
105	4,07	0,22	5.35	3.82	0,23	5.96	3.43	0,28	8.14	3	0,43	14.31	3	0,44	14.79	2.95	0,11	3.89
130	4.52	0,99	21.82	4.42	0,46	10,5	3.39	0,23	6.74	3,05	0,81	26.59	3.4	0,44	12.98	3,02	0,43	14.31

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,378

Tabla XXXII. Contenido de Calcio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Tallo						Raíz					
	Medio Normal			Medio salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	5.82	1.14	19.61	5.46	0,9	16.42	4.16	0,31	7.51	4.28	0,5	11.62
70	6.55	0,8	12.16	6.26	0,62	9.95	4.9	0,35	7.19	5,03	0,9	17.98
105	7.75	1.3	16.77	8.15	2.17	26.67	4.91	0,82	16.76	6.23	0,39	6.26
130	6.41	0,59	9.16	5.62	1.17	20,79	7.26	0,89	12.27	6,02	0,32	5.35

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,028

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,004

Tabla XXXIII. Contenido de Sodio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Tallo						Raíz					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	0,43	0,08	18,04	0,48	0,11	23.75	0,69	0,08	11.51	0,73	0,09	12.82
70	0,24	0,05	20,14	5.83	0,74	12.7	0,46	0,05	10,78	12,09	1.39	11.51
105	0,45	0,07	15.26	6.49	0,32	5	0,27	0,04	14.24	9.97	1.26	12.67
130	0,4	0,02	4.82	10,98	1.96	17.86	0,35	0,04	12.88	7,02	0,41	5.85

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,052

Tabla XXXIV. Contenido de Potasio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Tallo						Raíz					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	37.7	8.68	23,01	39.43	8.24	20,9	14.92	1.66	11.1	12.78	1,05	8.18
70	30,13	3.93	13,04	26.62	1.57	5.88	7.95	1,03	13,03	10,67	1.82	17,05
105	29.59	3.26	11	26.83	5.22	19.47	7.11	0,26	3.63	10,45	0,48	4.56
130	31.2	1.97	6.32	23.14	3.51	15.19	10	0,61	6,07	10,15	1.39	13.65

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,268

Tabla XXXV. Contenido de Magnesio en muestras de tallo y raíz de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino.

Día Extracción	Tallo						Raíz					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
35	2,02	0,1	4.74	2.21	0,21	9.51	1.25	0,29	23	1.22	0,05	3.89
70	2.34	0,23	9.93	1.86	0,26	13.91	0,81	0,11	14.22	1.29	0,1	7.89
105	1.83	0,17	9.43	1.9	0,25	12.96	0,57	0,08	13.78	0,86	0,12	13.48
130	1.81	0,15	8.49	1.6	0,09	5.44	0,54	0,08	15.12	0,81	0,03	4.23

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,144

Tabla XXXVI. Contenido de Calcio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.

Día Extracción	Hoja						Tallo					
	Hoja Normal			Hoja Salino			Tallo Normal			Tallo Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
48	11.54	1.15	10	11.39	0,59	5.2	2.71	0,51	18.98	2.86	0,5	17.5
52	14,07	1.41	10	10,95	1,08	9.91	3.79	0,31	8.26	2.95	0,26	8.88
56	3.19	0,3	9.51	10,16	0,67	6.55	3,06	0,53	17.33	13.1	1,02	7.82
61	6.17	0,59	9.51	7.19	1.82	25.36	3.1	0,54	17.33	4,05	0,9	22.22
66	9.97	0,54	5.44	9.24	0,84	9,09	3.79	0,26	6.8	3.31	0,51	15.41

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,002

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,157

Tabla XXXVII. Contenido de Sodio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.

Día Extracción	Hoja						Tallo					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
48	1.19	0,13	10,57	1.22	0,11	9.4	1.38	0,24	17.12	1.37	0,15	11.16
52	0,88	0,16	18	1.47	0,09	6.42	1.51	0,34	22.52	1.52	0,06	4.17
56	2.58	0,29	11,06	2.18	0,26	11.71	2.16	0,23	10,58	2.5	0,2	8,08
61	2.44	0,27	11,06	18.76	1,01	5.4	1.95	0,21	10,58	11.3	1.15	10,2
66	2.14	0,26	11.93	11.87	2.13	17.97	1.8	0,22	12,04	7.43	0,77	10,33

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,284

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,453

Tabla XXXVIII. Contenido de Potasio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.

Día Extracción	Hoja						Tallo					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
48	22.11	1.29	5.84	20,6	3.41	16.56	44.23	5.57	12.59	43.96	3	6.82
52	26.44	2.81	10,64	26.92	5.25	19.52	37.66	9.66	25.65	36.28	4.89	13.47
56	38.29	11,03	28.8	27.4	4.1	14.97	40,83	3.78	9.25	22.34	1.63	7.3
61	34.33	9.89	28.8	11.84	1.43	12,05	37.3	3.45	9.25	30,89	5.4	17.48
66	22.39	2.48	11,05	13.97	4,03	28.81	29.53	6.16	20,87	35.25	3.59	10,19

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,298

Tabla XXXIX. Contenido de Magnesio en muestras de hoja y tallo de tomate extraídas en diferentes tiempos de cultivo en medios Normal y Salino, con recuperación del estrés salino.

Día Extracción	Hoja						Tallo					
	Medio Normal			Medio Salino			Medio Normal			Medio Salino		
	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)	Media	DS	CV(%)
48	5.16	0,62	11.96	4.77	0,68	14.3	1.59	0,11	6.67	1.5	0,19	12.8
52	5.82	0,51	8.69	3.54	0,21	5.92	1.98	0,44	22.33	1.46	0,04	2.86
56	1.47	0,14	9.27	3.98	0,82	20,6	1.59	0,2	12.56	5.6	0,36	6.51
61	2.5	0,23	9.27	2.58	0,44	16.94	1.56	0,2	12.56	3.31	0,34	10,41
66	4.9	0,32	6.54	2.64	0,45	17.17	2.19	0,19	8.56	2.11	0,05	2.58

Tipo de Muestra: p valor por ANOVA = 0,000

Día de Extracción: p valor por ANOVA = 0,737